

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Der Einfluß von Botulinumneurotoxin A auf Wachstum und Differenzierung primär dissoziierter hippocampaler Zellkulturen

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Ingmar Fetter

geboren am 15.07.1973 in Neuruppin

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter: Prof. Dr. med. M. Gratzl
PD Dr. med. M. Bergmann
PD Dr. med. G. Grosse

Datum der Promotion: 28. Juni 1999

Einleitung	5
Die Synaptische Transmission	5
Der Zyklus synaptischer Vesikel	5
Präsynaptische Proteine und die SNARE-Hypothese	5
Das synaptische Vesikelprotein SNAP-25	8
Botulinumneurotoxine	9
Die Entwicklungsstadien der hippocampalen Zellkultur	10
Ziele der Arbeit	11
Material und Methoden	12
Geräte	12
Chemikalien	13
Gebrauchslösungen	16
Versuchstiere	18
Die primär dissoziierte hippocampale Zellkultur	18
Proteinnachweis mittels Westernblotverfahren	19
Nachweis von Proteinen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene	19
Die Avidin/Biotin-Methode	19
Der Fluoreszenznachweis von Proteinen in der Zellkultur	20
Die Pre-embedding-Methode für die elektronenmikroskopische Aufarbeitung	21
Photographische Dokumentation	21
Morphometrische Messungen	22
Ergebnisse	23
Die neuronale Entwicklung in der primär dissoziierten hippocampalen Zellkultur	23
Zelluläre Verteilung von SNAP-25 im lichtmikroskopischen Bild	31
Ultrastrukturelle Verteilung von SNAP-25	37
Der Einfluß von Botulinumneurotoxin A auf neuronale Zellkulturen	40
Nachweis von SNAP-25 in BoNT/A-behandelten neuronalen Zellkulturen	40
Qualitative Unterschiede zwischen BoNT/A-behandelten und Kontrollzellkulturen	41
Quantitative Unterschiede zwischen BoNT/A-behandelten und Kontrollkulturen	43
Der Einfluß von BoNT/A auf die regulierte Exozytose	44
Die Zelldichte unter BoNT/A-Einfluß	46
Die Wirkung von Botulinumneurotoxin C auf neuronale Zellkulturen	46
Diskussion	48
Die neuronale Entwicklung in der primär dissoziierten hippocampalen Zellkultur der embryonalen Maus	48
Die entwicklungsabhängige Proteinsynthese und Lokalisation von SNAP-25 in der primär dissoziierten hippocampalen Zellkultur	49
Der Einfluß von BoNT/A auf das Fortsatzwachstum kultivierter hippocampaler Neurone	50
Zusammenfassung	53
Schlußfolgerungen	54

Abstract:

Structure and dimension of the dendritic arbor are important determinants of information processing by the nerve cell, but mechanisms and molecules involved in dendritic growth are essentially unknown. I investigated early mechanisms of dendritic growth using mouse fetal hippocampal neurons in primary culture, which form processes during the first week in vitro. I detected a key component of regulated exocytosis, SNAP-25 (synaptosomal associated protein of 25 kDa), in axons and axonal terminals as well as in dendrites identified by the occurrence of the dendritic markers transferrin receptor and MAP2. Selective inactivation of SNAP-25 by botulinum neurotoxin A (BoNTA) resulted in inhibition of axonal growth and of vesicle recycling in axonal terminals. In addition, dendritic growth of hippocampal pyramidal and granule neurons was significantly inhibited by BoNTA. These observations indicate that SNAP-25, but not synaptobrevin, is involved in constitutive axonal growth and dendrite formation by hippocampal neurons.

Keywords: dendrite; SNAP-25; botulinum neurotoxin A; mouse hippocampal neurons

Zusammenfassung:

Obwohl die Struktur und das Ausmaß dendritischer Verzweigungen eine wichtige Rolle bei der Informationsübertragung neuronaler Zellen spielen, ist bislang wenig über die Bausteine und Molekularmechanismen des Dendritenwachstums bekannt. Unter der Verwendung primär dissoziierter hippocampaler Zellkulturen embryonaler Mäuse untersuchte ich frühe Stadien des Zellfortsatzwachstums. Dabei konnte ich SNAP-25 (synaptosomal associated protein of 25 kDa), ein Schlüsselprotein der regulierten Exozytose, nicht nur in Axonen und terminalen Axonendigungen, sondern auch anhand von Doppelimmunmarkierungen mit den dendritischen Markern Transferrin-Rezeptor und MAP-2 in Dendriten lokalisieren. Die spezifische Inaktivierung von SNAP-25 durch Botulinumneurotoxin A (BoNT/A) führte zur Hemmung des Axonwachstums und des Vesikelrecyclings in terminalen Axonendigungen. Darüberhinaus wurde auch das Wachstum dendritischer Fortsätze von Körner- und Pyramidenzellen durch BoNT/A signifikant gehemmt. Daraus läßt sich schließen, daß SNAP-25, im Gegensatz zu Synaptobrevin, an konstitutiven Prozessen in den Axonen und Dendriten hippocampaler Neurone beteiligt ist.

Schlagwörter: Dendrit; SNAP-25; Botulinumneurotoxin A; hippocampale Zellkulturen

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Frau PD Dr. G. Große für die Bereitstellung des Themas und für die Präparation der hippocampalen Zellkulturen. Während der gesamten Zeit unserer Zusammenarbeit und der Manuskripterstellung kamen mir ihre Erfahrung und Besonnenheit zugute.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. R. Tapp für ihre exzellenten elektronenmikroskopischen Bilder sowie Frau Prof. Dr. G. Ahnert-Hilger für wertvolle Hinweise und ihre freundliche Unterstützung bei der experimentellen Arbeit.

Frau A. Löchner und Frau H. Heilmann möchte ich für die Einarbeitung in die verschiedenen immunzytochemischen Arbeitstechniken danken. Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau R. Wachenschwanz und Frau Lewandowski aus der Photoabteilung des Instituts sowie Herrn J. Kuchinke für die Hilfe bei der statistischen Datenanalyse.

Hervorheben möchte ich auch den großen Rückhalt und die Unterstützung aus meiner Familie.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ATP	Adenosintriphosphat
BoNT	Botulinumneurotoxin
CLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop
DIV	Day(s) in vitro, Tag(e) in vitro
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
kDa	Kilodalton
LDCV	Large dense core vesicle, große dichte Vesikel
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NO	Nitric oxide, Stickoxid
NSF	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
PBS	Phosphate Buffer Saline
PKC	Proteinkinase C
rER	rauhes, ribosomenbesetztes endoplasmatisches Retikulum
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean, Standardabweichung des Mittelwertes
SNAP(s)	Soluble NSF attachment proteins
SNAP-25	Synaptosomal associated protein of 25 kDa
SNARE	SNAP-Rezeptor-Protein
Sy	Synaptophysin
TeNT	Tetanusneurotoxin
t-SNARE	Target-membrane associated SNAP-receptor protein
v-SNARE	Vesicle-membrane associated SNAP-receptor protein

Einleitung

Die Synaptische Transmission

Bei der synaptischen Transmission werden mit hoher Präzision und Geschwindigkeit Informationen von einer Nervenzelle auf eine andere übertragen. Man kann zwischen chemischen und elektrischen Synapsen, sowie gemischten Formen unterscheiden. An der chemischen Synapse erfolgt die Übertragung des Nervenimpulses durch einen Neurotransmitter, eine Substanz, die von den Nervenzellen gebildet und an den Synapsen freigesetzt wird. Auf der postsynaptischen Seite befinden sich Transmitterrezeptoren, die bei Aktivierung durch direkten oder indirekten Einfluß auf Ionenkanäle Potentialänderungen bewirken. Das Aktionspotential der Präsynapse wird in ein chemisches und wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt. Gemeinsam sind allen chemischen Synapsen auf der präsynaptischen Seite Mitochondrien, synaptische Vesikel, Strukturproteine und die präsynaptische Plasmamembran. Die Koexistenz verschiedener Transmitter an einer Synapse ist nicht selten. Ein Teil der transmittergefüllten Vesikel ist an der Plasmamembran angelagert (Betz1992), um nach Kalziumeinstrom mit der Plasmamembran zu fusionieren und Transmitter in den synaptischen Spalt abzugeben. Der synaptische Spalt ist 10 – 40 nm breit.

Der Zyklus synaptischer Vesikel

Die mit der Plasmamembran fusionierten synaptischen Vesikel werden nach der Transmitterausschüttung in die Präsynapse zurückgeführt. Im klassischen Endozytoseweg vermitteln vesikuläres Synaptotagmin und ein Adapterprotein die Umhüllung der Vesikel mit einem Clathrinmantel (Maycox1992; Zhang1994). Größere Plasmamembrananteile mit den darauf feststehenden, clathrinumhüllten Vesikeln werden invaginiert. Die GTPase Dynamin trennt die Vesikel von der Vakuolenmembran (Takei1996). Im Zytoplasma wird der Clathrinmantel enzymatisch abgespalten. Der Membranaufbau der Vesikel bleibt während der Regeneration unverändert (Murthy1998). Nach der Transmitterbeladung im Zytoplasma stehen die Vesikel für die erneute Exozytose bereit (Bauerfeind1996). Ein gesamter Zyklus dauert weniger als eine Minute, wobei die Exozytose weniger als 1 ms, die Endozytose ca. 5 s und die Regeneration der Vesikel die restliche Zeit beansprucht (Betz1992; Ryan1993).

Die Geschwindigkeit der synaptischen Exozytose und Endozytose ist vom Kalziumeinstrom in die Zelle abhängig. Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration hemmt die Dynaminaktivität (Matthews1996). Da sich bei Kalziumeinstrom aber die Endozytosegeschwindigkeit erhöht (Klingauf1998), ist ein weiterer, clathrinunabhängiger Endozytoseweg sehr wahrscheinlich.

Präsynaptische Proteine und die SNARE-Hypothese

Ein molekularbiologisches Modell für die Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt liefert die SNARE-Hypothese (Söllner1993a, Söllner1993b). Darin bilden das synaptische Vesikelprotein Synaptobrevin und die in der präsynaptischen Plasmamembran verankerten Proteine Syntaxin und SNAP-25 (Synaptosomal-associated protein of 25 kDalton) einen Komplex (SNARE-Komplex, 7S-Komplex oder Fusionskomplex). Wenn an den 7S-Komplex lösliche NSF attachment proteins (SNAPs) und das N-Ethyl-maleimid sensitive fusion protein (NSF) anbinden, entsteht ein 20S-Komplex (Söllner1993a). Die ATPase NSF bewirkt den Zerfall des Komplexes und die Fusion der Vesikel- und Plasmamembran (Söllner1993a, Söllner1993b). Syntaxin als in der Plasmamembran verankertes Protein (Bennett1992) und SNAP-25 als an die Plasmamembran durch Palmitoylierung gebundenes Protein (Hess1992) werden als t-SNAREs (target membrane associated SNAP-receptor), Synaptobrevin wegen seiner Erstbeschreibung an Vesikeln (Trimble1988; Baumert1989) als v-SNARE (vesicle membrane associated SNAP-receptor) bezeichnet.

Die SNARE-Hypothese läßt sich auf nichtsynaptische Fusionsereignisse erweitern (Rothman1994), wobei die Spezifität mit dem Vorkommen von Isoformen der beteiligten Proteine gewahrt wird. Es

konnte wiederholt gezeigt werden, daß Fusionsereignisse in den verschiedensten eukaryotischen Organismen auf dem gleichen Mechanismus beruhen (Bennett1993a; Rothman1994; FerroNovick1994; Rothman1996). Durch die nachfolgend geschilderten Ergebnisse ist die SNARE-Hypothese seitdem präzisiert und korrigiert worden

Die minimalen Bindungsregionen der SNARE-Proteine untereinander wurden unter Verwendung rekombinanter Eiweiße und clostridialer Neurotoxine erforscht (Chapman1994 ; Hayashi1994; Hayashi1995; Kee1995; Pellegrini1995; Fasshauer1997; Hao1997; Zhong1997; Fasshauer1998) und sind im nachfolgenden Schema (Abb. 1) dargestellt. Die SNAP-25-Bindungsregion von Syntaxin (H3-Domäne) liegt nahe an der transmembranen Domäne. In dieser Region können auch Synaptobrevin, Synaptotagmin und α -SNAP an Syntaxin binden. Von Synaptobrevin ist fast die gesamte zytoplasmatische Domäne für die Fusionskomplex-Bildung notwendig, von SNAP-25 das C-terminale und das N-terminale Ende.

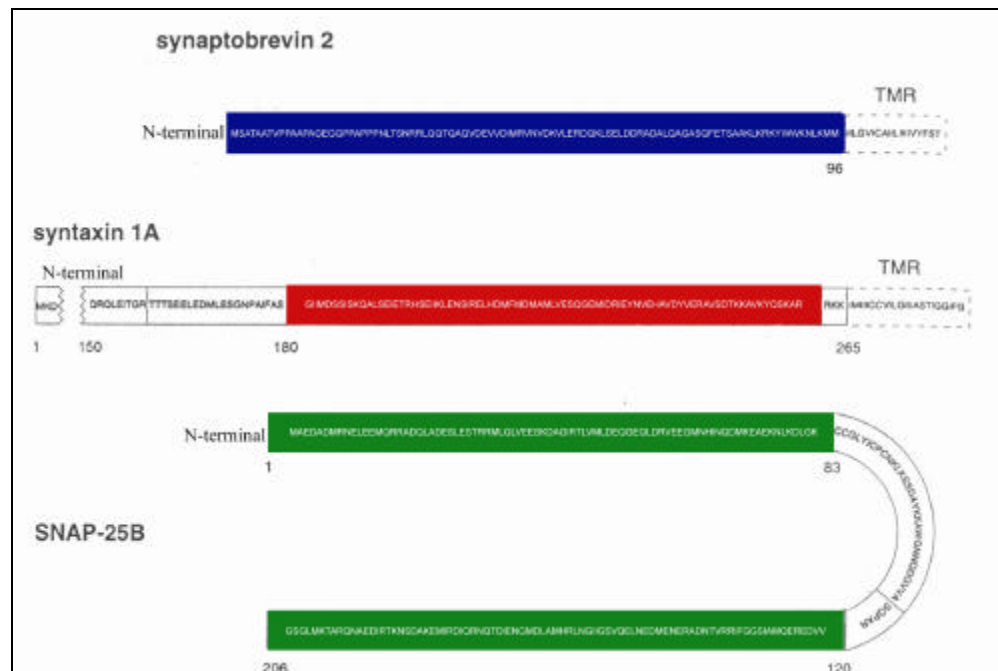


Abbildung 1: Die minimalen Bindungsregionen der SNARE-Proteine (nach Fasshauer1998)

Die SNARE-Proteine SynaptobrevinII, SNAP-25B und Syntaxin1A sind schematisch mit ihren Aminosäuresequenzen dargestellt. Die minimalen Bindungsregionen für-einander sind farbig unterlegt. Mit TMR sind die transmembranösen Domänen im C-terminalen Anteil von Synaptobrevin und Syntaxin markiert. Die cysteinreiche Region im SNAP-25-Molekül, die durch Palmitoylierung die Verankerung von SNAP-25 in Membranen ermöglicht, ist bogenförmig dargestellt.

Die Analyse der Aminosäuresequenzen (Primärstruktur) der SNARE-Proteine offenbarte die Fähigkeit der SNARE-Proteine zur Bildung von α -Helices (Sekundärstruktur). Darin sind hydrophobe Aminosäuren so angeordnet (wiederkehrende Heptagonsequenzen), daß einem Algorithmus (Lupas1991) zufolge die α -Helices der verschiedenen Proteine sich im Fusionskomplex zu einer Superhelix (Quartärstruktur; engl. coiled coils) verdrehen können (Calakos1994b; Chapman1994). Mithilfe spektroskopischer Untersuchungsmethoden konnte gezeigt werden, daß die SNARE-Proteine tatsächlich α -Helices bilden. Der Anteil der α -Helices an der Sekundärstruktur der Proteine steigt während der SNARE-Komplex-Bildung (Fasshauer1997; Zhong1997). Die Vermutung, daß sich eine Superhelix bildet, erhärten Mutationsversuche an Syntaxin. Dabei verhindert die Deletion von Aminosäuren innerhalb der Heptagonsequenzen von Syntaxin die Anbindung von Synaptobrevin (Kee1995).

Syntaxin und SNAP-25 konnten auch in Vesikelmembranen nachgewiesen werden (Walch1995; HöhneZell1996; Kretzschmar1996). SNARE-Komplexe können durch SNARE-Proteine, die ausschließlich in einer Membran verankert sind, gebildet werden (Otto1997). Um ein Fusionsereignis herbeizuführen, müssen v-SNAREs und t-SNAREs aber in gegenüberliegenden Membranen lokalisiert sein (Nichols1997). Syntaxin und Synaptobrevin sind im SNARE-Komplex parallel zueinander angeordnet (Hanson1997a). Danach hat der SNARE-Komplex die Form eines 14 nm langen Bündels bestehend aus vier ausgestreckten α -Helices. Der Durchmesser dieser Superhelix beträgt 4 nm. Das Synaptobrevinmolekül wird bei der Bündelung dicht an der Vesikelmembran geknickt (Lin1997; siehe Abb. 2). SNAP-25 ist am Fusionskomplex mit zwei zueinander parallelen Helices beteiligt, die durch eine membranbindende Domäne miteinander verbunden sind. Bennett und Mitarbeiter zeigten, daß diese membranbindende Domäne von SNAP-25 auf der gleichen Seite des Bündels wie die transmembranösen Domänen von Syntaxin und Synaptobrevin liegt (Poirier1998). Nur diese Anordnung ermöglicht eine enge räumliche Beziehung der prädestinierten Bindungsstellen zueinander. Eine genaue Topographie, einschließlich potentieller Bindungsstellen und der Spaltungsstellen clostridialer Neurotoxine, erstellten Jahn und Mitarbeiter (Sutton1998; Abb. 2). Sie vermuten eine aktive Beteiligung der transmembranösen Domänen von Synaptobrevin und Syntaxin an der Fusionsreaktion.

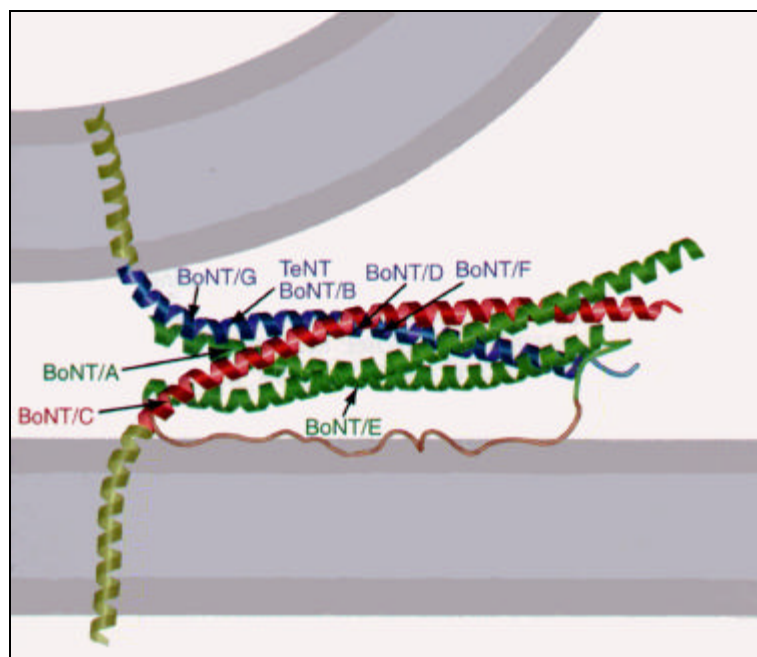


Abbildung 2: Der synaptische Fusionskomplex
(nach Sutton1998)

Die α -helicalen Anteile von Syntaxin1A (rot), SynaptobrevinII (blau) und SNAP-25B (dunkelgrün) sind gewunden dargestellt. Die SNARE-Proteine verdrillen sich zu einer Superhelix, wobei Syntaxin1A und SynaptobrevinII in gegenüberliegenden Membranen (grau) verankert sind. Die transmembranösen Domänen (hellgrün) können ebenfalls Helices bilden. Die SNAP-25-Helices sind durch eine Polypeptidkette (braun) verbunden. SynaptobrevinII wird durch TeNT und BoNT/B zwischen Gln76 und Phe77, durch BoNT/F zwischen Gln58 und Lys59, durch BoNT/G zwischen Ala 81 und Ala82 und durch BoNT/G zwischen Lys59 und Leu60 gespalten. BoNT/C spaltet Syntaxin1A zwischen Lys253 und Ala254. SNAP-25 wird durch BoNT/E zwischen Asp193 und Glu194 und durch BoNT/A zwischen Arg176 und Gln177 gespalten.

Hayashi und Mitarbeiter (Hayashi1994) entdeckten, daß clostridiale Toxine die SNARE-Komplex-Proteine nur vor der Komplexbildung spalten können. Es waren aber auch in toxinvergifteten Zellen angedockte Vesikel zu beobachten (Hunt1994). Demnach kann der SNARE-Komplex nicht für das Vesikel-Docking an der präsynaptischen Membran verantwortlich sein (Südhof1995). Das Andocken der Vesikel trotz Synaptobrevin-Inaktivierung wird durch eine Bindung zwischen SNAP-25 und vesikulärem Synaptotagmin ermöglicht (Schiavo1997).

Die Bildung des Fusionkomplexes unterliegt dem Einfluß eines komplexen Steuerungsmechanismus. Syntaxin kann sowohl mit SNAP-25 (Pevsner1994) als auch Synaptobrevin einen binären Komplex bilden (Calakos1994b). Wenn das Protein n-sec1 (munc18) an Syntaxin bindet, kann sich Syntaxin nicht mit SNAP-25 und Synaptobrevin zusammenlagern (Pevsner1994). Die Bindungsrate von n-sec1 wird durch Stickstoffmonoxid (Meffert1996) und rab-GTPasen (Lupashin1997 ; Rothman1996) beeinflusst. Eine N-terminale Domäne von Syntaxin verlangsamt die Fusionskomplexbildung. Wird sie abgespalten, so bilden sich Fusionskomplexe mit 2.000-fach höherer Geschwindigkeit (Nicholson1998). Die Verfügbarkeit von Synaptobrevin wird durch die Komplexbildung mit Synaptophysin beeinflusst (Edelmann1995; Ahnert-Hilger1996). Schließlich können Phosphorylierungen die Eigenschaften der SNARE-Proteine beeinflussen (Hirling1996).

Der Kalziumsensor der synaptischen Fusion ist das synaptische Vesikelprotein Synaptotagmin. Die Deletion des Synaptotagmin-Gens führt bei Mäusen zu einer deutlich verringerten Transmitterfreisetzung (Geppert1994). Während des Kalziumeinstroms bindet Synaptotagmin an Syntaxin (Kee1996). Dadurch wird eine Konformationsänderung am Syntaxinmolekül hervorgerufen, welche die Fusionsreaktion beschleunigt (Shao1997).

Sehr wahrscheinlich ist mittlerweile, daß die Spaltung des SNARE-Komplexes durch NSF nicht direkt zur Fusionsreaktion beiträgt, sondern die Vesikel auf das Andocken und Fusionieren vorbereitet (Banerjee1996; Colombo1996; Mayer1996; Nichols1997).

Das synaptische Vesikelprotein SNAP-25

1986 beschrieben Branks und Wilson die Exprimierung einer mRNA (messenger RNA) ausschließlich im Gehirn. Mithilfe eines spezifischen Antikörpers wurde daraufhin ein 25 kDa schweres Protein in Hippocampi adulter Mäuse detektiert (Oyler1989). Wegen seiner Lokalisation in der Präsynapse nannte man es *Synaptosomal associated protein of 25 kDa*, SNAP-25. Bei der Analyse der Aminosäuresequenz wurde festgestellt, daß das Protein nicht über Phospholipide an Membranen anbinden kann (fehlende Freisetzung durch Phospholipase C), dafür aber vier zusammenliegende Cysteinmoleküle (Oyler1989) die Möglichkeit der Anbindung an andere Strukturen durch Palmitoylierung geben (Sefton1987). Hess und Mitarbeiter (Hess1992) bestätigten diese Annahme.

Experimentelle Läsionen hippocampaler Faserbahnen hatten den Verlust der SNAP-25-Immunreaktion zur Folge, während typische Postsynapsenmarker weiterhin ihre Zielstrukturen markierten (Geddes1990). Seitdem galt SNAP-25 als neuer Marker für präsynaptische Axonanteile. Bei Untersuchungen an der Retina von Hühnern beobachteten Catsicas und Mitarbeiter (Catsicas1991) eine zunehmende SNAP-25 - Exprimierung während der embryonalen Synaptogenese. Aus der Tatsache, daß sich während der Evolution nur geringfügige Veränderungen in der Proteinstruktur ergaben, wurde SNAP-25 eine streng strukturbezogene Funktion an der Synapse zugeschrieben (Risinger1990; Catsicas1991). In situ-Untersuchungen an Ratten und Kaninchen zeigten, daß SNAP-25 während der prä- und postnatalen Entwicklung in den Perikarya der Nervenzellen produziert und über den schnellen axonalen Transport in die Präsynapse transportiert wird (Oyler1991; Loewy1991). SNAP-25 existiert in zwei Isoformen (Bark1993). SNAP-25A wird überwiegend in frühen pränatalen Entwicklungsstadien exprimiert, SNAP-25B dagegen während der Synaptogenese und in adulten Nervenzellen (Bark1995; Wilson1996). Während der Synaptogenese verdoppelt sich in vitro die SNAP-25 - Halbwertszeit (Sanders1998). SNAP-25 wird durch BoNT/A, BoNT/C und BoNT/E proteolytisch gespalten (Blasi1993a; Binz1994; Williamson1996). Die überwiegend in nichtneuronalen Zellen vorkommende Isoform SNAP-23 (Ravichandran1996, Wong1997) wird in vitro nicht durch BoNT/E inaktiviert und kann in endokrinen Pankreaszellen SNAP-25 bei der Insulinsekretion ersetzen (Sadoul1997).

Botulinumneurotoxine

Clostridium botulinum wurde zuerst von Van Ermengem 1897 beschrieben. Er barg den Erreger aus einem verdorbenen Schinken und dem Mageninhalt eines nach dem Genuß besagten Schinkens verstorbenen Menschen. Van Ermengem gab dem Erreger den Namen *Bacillus botulinus* (*botulus* = Wurst), weil die Leidenmerkmale einer von Kerner bereits 1820 beschriebenen Wurstvergiftung sehr ähnlich waren.

Botulismus ist ein durch fortschreitende Muskelparalyse gekennzeichnetes Krankheitsbild. Die ersten Krankheitssymptome nach einer Latenz von 12-36 Stunden sind Doppeltssehen, Ptosis, Lichtempfindlichkeit und Schluckbeschwerden. Es treten Kopfschmerzen, Benommenheit und abdominelle Beschwerden auf. Die kranio-kaudal fortschreitende Lähmung führt zu Stimmlosigkeit und Atemnot. Der Tod tritt infolge Ateminsuffizienz und Kreislaufversagen ein. Die kausale Therapie der Krankheit ist die Gabe von Antitoxin. Wenn die Diagnose nicht rechtzeitig gestellt wird, kann der letale Ausgang nur durch intensivmedizinische Maßnahmen bis zum Abklingen der Vergiftungserscheinungen verhindert werden (Rogawski1989).

Der Pathomechanismus, die Hemmung der Acetylcholinfreisetzung, ist seit 50 Jahren bekannt (Burgen1949). Die letale Dosis von wenigen Nanogramm des aufgenommenen Giftes kennzeichnet die hochgradige Toxizität. Man unterscheidet inzwischen drei Formen des Botulismus voneinander. Die häufigste Form ist der einleitend erwähnte Foodborne-Botulismus nach Aufnahme toxinhaltiger Nahrung. Außerdem gibt es eine infantile Form des Botulismus (Arnon1992). Im infizierten Darm der Neugeborenen können sich die Clostridien ungehindert vermehren, da sich noch nicht die normale Darmflora angesiedelt hat, welche die Clostridienentwicklung hemmt. Die dritte Form ist der Botulismus durch Wundinfektion. Opfer sind meist polytraumatisierte Patienten und Drogensüchtige (Rogawski1989). Fast 90 % der Botulismustfälle sind Intoxikationen durch die Serotypen BoNT/A und /B und nur 10 % Vergiftungen durch BoNT/E. Einzelfälle über eine BoNT/F-Intoxikation sind beschrieben. Es gibt Fälle des plötzlichen Kindstodes (SIDS), bei denen eine Botulinuminfektion nachgewiesen wurde (Rogawski1989).

Die Clostridiumneurotoxine sind intrazellulär wirkende Gifte. Zellmembranen stellen für diese Proteine Barrieren dar. Die Toxine gehören zu den AB - Toxinen, da sie aus einem Komplex von zwei Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen bestehen. Das A symbolisiert den pharmakodynamisch aktiven Enzymanteil, während der Bindungsanteil für die Zellpenetration (Pharmakokinetik) verantwortlich ist. Die Toxine werden als einsträngige Polypeptide mit einem Gewicht von ca. 150 kDa synthetisiert. Darin ist die C-terminale schwere Kette (100 kDa) mittels Disulfidbrücke und hydrophober Wechselwirkungen mit der N-terminalen leichten Kette (50 kDa) verbunden (Matsuda1989). Die leichten Ketten können sich mit verschiedenen schweren Ketten zu Dimeren verbinden (Weller1991). Jede einzelne Untereinheit ist allein ungiftig, da sie entweder nicht in die Zielzelle eindringen, oder dort keine Toxizität entfalten kann. Ziel der Clostridiumneurotoxine sind Proteine des synaptischen Exozytoseapparates (Ahnert-Hilger1995).

Da Botulinustoxine mit verdorbener Nahrung aufgenommen werden, müssen sie zunächst an Hämagglutinine binden, um auf diese Weise dem Angriff von Verdauungsenzymen des Darmes zu entgehen und die Darmwand passieren zu können (Ahnert-Hilger1995). Der Mechanismus der Darmwandpassage und der Penetration ins Nervensystem ist noch unbekannt.

Die Ursache der hohen Affinität der Toxine für neuronale Zellen liegt in ihrer Bindungsspezifität für einen Proteinrezeptor und Ganglioside mit zwei oder drei Neuraminsäureresten. Diese Kombination findet man nur in Nervenzellmembranen und dort vor allem synapsennah. Anderen Geweben fehlt eine dieser Bindungskomponenten (Ahnert-Hilger1995). Im Gegensatz zu den anderen Botulinumneurotoxinen gelang für BoNT/B die Identifizierung von Synaptotagmin II als Rezeptorprotein (Nishiki1994).

Die Bindungsstelle auf Seiten der Toxine liegt im C-terminalen Anteil der schweren Kette (Simpson1989). In diesem Stadium der Anreicherung auf der Zellmembranoberfläche ist *in vivo* noch eine Neutralisation durch Antikörper möglich.

Der plasmalemmale Rezeptor vermittelt eine vesikuläre Endozytose (Morris1989). Der weitere retrograde axonale Transport ist auf der schweren Kette codiert, denn komplettes Toxin und iso-

lierte schweren Ketten, nicht aber isolierte leichte Ketten, werden axonal transportiert. Weller und Mitarbeiter (Weller1991) kombinierten BoNT/A-schwere Ketten mit leichten Ketten von TeNT. Die Pharmakokinetik entsprach der von BoNT/A. Damit die leichte Kette aus dem Transportvesikel ins Zytosol gelangt, sind eine Ansäuerung des Vesikellumens durch eine Protonenpumpe und eine Porenbildung durch die schwere Kette notwendig (Habermann1989).

Mit der Entdeckung einer Zink-bindenden Region auf der leichten Kette des TeNT, die homolog zu der bekannter Zink-Metalloproteasen war, wurde der Schlüssel für den molekularen Wirkmechanismus gefunden. Diese Zink-bindende Region fand man auch in den Botulinumneurotoxinen (Schiavo1992aSchiavo1992b).

Parallel zur Entwicklung der SNARE-Hypothese (Söllner1993aSöllner1993b) entdeckte man, daß die SNARE-Proteine das proteolytische Substrat der Clostridiumneurotoxine sind. Syntaxin wird durch BoNT/ C1 (Blasi1993b), SNAP-25 durch BoNT/A, C und E (Blasi1993a; Binz1994; Williamson1996) und Synaptobrevin durch TeNT und BoNT/ B, D, F und G (Schiavo1992a, Schiavo1992b; Yamasaki1994a, Yamasaki1994b) gespalten. Neben der Spaltungsstelle haben Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin eine allen drei Proteinen gemeine Toxinbindungsstelle (Rossetto1994). Dieses neun Aminosäuren lange Motif liegt jeweils in einem α -helicalen Abschnitt der drei SNARE-Proteine (Chapman1994). Wahrscheinlich beruht darauf die gegenseitige Blockierung von TeNT und BoNT/A bei gleichzeitiger Applikation (Pellizzari1996, Pellizzari1997).

Die Entwicklungsstadien der hippocampalen Zellkultur

Die neuronale Entwicklung ist durch Fortsatzwachstum, Polarisierung und Ausbildung synaptischer Kontakte gekennzeichnet. Zur Erforschung dieser Reifungsvorgänge hat sich das Kultursystem primär dissoziierter, hippocampaler Neurone bewährt. Die Neurone polarisieren frühzeitig, das Wachstum von Axonen und Dendriten sowie die synaptische Reifung sind gut zu beobachten. Die gezielte Beeinflussung dieser Entwicklungsprozesse ermöglicht die Erforschung ihrer molekularen Mechanismen. Deshalb wurde dieses Modellsystem zu Untersuchungen über die Funktion des synaptischen Vesikelproteins SNAP-25 benutzt.

Dotti, Sullivan und Banker (Dotti1988) führten videomikroskopische Untersuchungen an hippocampalen Zellkulturen der fetalen Ratte durch. Ihre Beobachtungen faßten sie in der nachfolgenden Stadieneinteilung für die Entwicklung hippocampaler Neurone in der Zellkultur zusammen.

Stadium 1: Unmittelbar nach der Zellaussaat sind überall an den fortsatzlosen Neuronen kleine bewegliche Scheinfüßchen, Lamellipodien, zu beobachten. Lamellipodien sind *in situ* nicht zu beobachten. Wahrscheinlich dienen sie der Zellanheftung auf dem Kulturschalenboden.

Stadium 2: Nach wenigen Stunden entwickeln sich kurze, uniforme Prozesse, sogenannte *minor processes*. Eine Unterscheidung in Axon und Dendriten ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

Stadium 3: 24 - 48 Stunden nach Zellaussaat wächst einer der kleinen Fortsätze deutlich schneller als die übrigen. Dieser *minor process* wird zum Axon.

Stadium 4: Die verbliebenen *minor processes* entwickeln sich zu Dendriten. Ein signifikantes Längenwachstum der Dendriten beginnt erst am vierten Tag *in vitro*. Bis dahin zeigen sie ein gegenüber dem Axon retardiertes Wachstum.

Stadium 5: Kennzeichnend ist die Reifung der stark polarisierten Nervenzelle. Axone und Dendriten können bis zu einer Länge von mehreren Millimetern auswachsen. Die Dendriten verzweigen sich (Arborisierung). Die Axone bilden Kollaterale und synaptische Kontakte.

Ziele der Arbeit

Anhand der Zellmorphologie, des Zellwachstums und der Synaptogenese wird die neuronale Entwicklung in der primär dissoziierten hippocampalen Zellkultur der fetalen Maus charakterisiert.

Am Modell primär dissoziierter hippocampaler Zellkulturen soll die Verteilung des synaptischen Vesikelproteins SNAP-25 in verschiedenen Entwicklungsstadien im Vergleich zu anderen präsynaptischen Proteinen untersucht werden.

Anhand der zellulären Verteilung von SNAP-25 und der Zellmorphologie wird die Wirkung von BoNT/A auf hippocampale Neurone untersucht.

Fortsatzlängenmessungen an BoNT/A-vergifteten Neuronen sollen klären, ob SNAP-25 bei der konstitutiven Exozytose eine funktionelle Bedeutung hat.

Material und Methoden

Geräte

- Acryl-Küvetten, Fa. Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
- Autoklav, Fa. Gössner, Modell GVA 4, 6 - 3, Hamburg, Deutschland
- Blotkammer, Fa. Hoefer Scientific Instruments, USA
- Brutschrank, Fa. Heraeus, Modell B 5060, Hanau, Deutschland
- Elektrophorese-Kammer, Fa. Hoefer Scientific Instruments, USA
- Einmalpipetten, Fa. Falcon, 5, 10, 25 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalröhrchen, Fa. Falcon, Blue Max, 50 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalröhrchen, Fa. Falcon, 10 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalspritzen, Fa. Braun, 10 ml, Melsungen, Deutschland
- Gelrockner, Fa. Biometra, Modell D 61, Göttingen, Deutschland
- Kulturschalen, Fa. Greiner, 36/10 mm, Frickenhausen, Deutschland
- Kulturschalen, Fa. Greiner, 60/15 mm, Frickenhausen, Deutschland
- Kulturschalen, Fa. Nunc, 4 well Multidish, Roskilde, Dänemark
- Laborwaagen, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Laminar-Flow-Bench, Fa. BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
- Laserscanning-Einheit MRC-600, Fa. BioRad, Hemel Hempstead, UK
- LIA-mat System 300, Fa. BYK-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Deutschland
- Mikroskop, Fa. Zeiss, Axiovert 135 mit Fotoausstattung Ricoh KR-10 M, Oberkochen, Deutschland
- Mikroskop Diaphot, Fa. Nikon, Düsseldorf, Deutschland
- Pasteurpipetten, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- pH-Meter, Fa. WTW, Modell 537, Weilheim, Deutschland
- Photometer, Fa. MiltonRoy, Modell Spectronic 601, Rochester, USA
- Pipettenspitzen, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Pipettierhilfe, Fa. Hirschmann, Modell Pipetus-Aku, Eberstadt, Deutschland
- Pipettierhilfen, Fa. Gilson, Modell Pipetman P, Villiers-le-Bel, Frankreich
- Schlauchpumpe, Fa. ABIMED, Modell Minipuls 2, Langenfeld, Deutschland
- Schüttelwasserbad, Fa. GFL, Modell 1083, Burgwedel, Deutschland

- Schüttler, Fa. IKA-Labortechnik, Modell MTS 4, Staufen, Deutschland
- Stereolupe, Fa. Zeiss, Modell SV 11, Oberkochen, Deutschland
- Sterilfilter 150 ml, Fa. Nalgene, Modell 1550020, Hereford, U.K.
- Sterilfilter 500 ml, Fa. Nalgene, Modell 1564020, Hereford, U.K.
- Sterilfilter aufsteckbar, Fa. Schleicher & Schuell, FP 030/3, Dassel, Deutschland
- Tischzentrifuge, Fa. Hettich, Modell Universal, Tuttlingen, Deutschland
- Transelektronenmikroskop, Fa. Zeiss, Modell EM 900, Oberkochen, Deutschland
- Trockenheiluftsterilisator, VEB MLW Medizinische Geräte, Modell 113-0100, Berlin, DDR
- Ultraschallhomogenisator, Fa. Bandelin, Berlin, Deutschland
- Ultrotom, Fa. Reichert, Modell Ultracut S, Wien, Österreich
- Vortex, Fa. IKA-Labortechnik, Modell G 560 E, Staufen, Deutschland
- Wärmeschrank, VEB MLW Medizinische Geräte, Berlin, DDR

Chemikalien

- ABC-Peroxidase-Kit, Fa. Vector, Burlingame, USA
- Acrylamid, Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
- Albumin, bovine, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- AMPA (S- ∞ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid), Fa. Tocris, Bristol, UK
- anti-mouse-IgG, goldmarkiert, Auro Probe One GAM, Fa. Amersham
- anti-rabbit-IgG, goldmarkiert, Auro Probe One GAR, Fa. Amersham
- apo-Transferrin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Aprotinin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Basal Medium Eagle (BME), mit Earles Salts und Glutamax I, Fa. Gibco, Eggenstein, Deutschland
- biotinyliert-goat anti rabbit (IgG, H+L), Fa. Vector, Burlingame, UK
- biotinyliert-horse anti mouse (IgG, H+L), Fa. Vector, Burlingame, UK
- Bisacrylamid, Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
- Bleinitrat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- BPST (2-(2'-Benzothiazolyl)-5-Styryl-3-(4'-Phtal- Hydrazidyl)-tetrazolium chloride), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Calciumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chloralhydrat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- DAB (Diaminobenzidin), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland

- Dinatriumhydrogenphosphat, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- DMSO (Dimethylsulfoxid), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- EDTA (Ethylen-dinitrilo-tetra-Essigsäure-di-Natrium-Dihydrat), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Epon 812, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Accelerator DMP30, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Hardener DDSA, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Hardener MNA, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Ethanol, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Fetales Kälberserum (FKS) steril, Fa. Gibco, Eggenstein, Deutschland
- FITC-anti-rabbit made in goat (IgG, H+L), Fa. Vector, Burlingame, UK
- Glukose, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Glutaraldehyd 70 %, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glycin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- HEPES, Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
- HPMA (Hydroxypropylmetacrylat), Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- HRP (Horseradish peroxydase) type II, 200U/mg, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Immuno-Mount, Fa. Shandon, Cleshire, UK
- Insulin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Kaisers-Glycerin-Gelatine, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Längenmarker für Elektrophorese, Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland
- Magnesiumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Methanol, Fa. Baker, Deventer, Niederlande
- monoclonal anti-MAP-2 made in mouse (IgG1), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- monoclonal anti-SNAP-25 made in mouse, SMI 81, Fa. Sternberger, Baltimore, USA
- monoclonal anti-Synaptobrevin made in mouse, clone 69.1, von R. Jahn freundlichst zur Verfügung gestellt
- monoclonal anti-Synaptophysin made in mouse, Fa. Progen, Heidelberg, Deutschland
- monoclonal anti-Syntaxin made in mouse, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Na-Pyruvat (100 mM), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Na-Selenite, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Natriumazid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

- Natriumcacodylat, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Natriumchlorid, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Natriumcitrat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumdihydrogenphosphat, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Natriumhydroxid, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Nitrozellulose-Membran, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
- NMDA (N-Methyl- D-Aspartate), Fa. Tocris, Bristol, UK
- Osmiumtetraoxid, Fa. Plano, Marburg, Deutschland
- Paraformaldehyd, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Pferdeserum (für die Zellkultur), Fa. Gibco, Eggenstein, Deutschland
- Pferdeserum, Fa. Vector, Burlingame, UK
- polyclonal anti-SNAP-25, MC 21, von P. De Camilli freundlichst zur Verfügung gestellt
- polyclonal anti-Synaptophysin made in rabbit, Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
- polyclonal anti-Transferrin made in rabbit, Fa. Zymed Lab. Inc., San Francisco, USA
- Poly-D-Lysin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ponceau S, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Saccharose, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Saccharose, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat), Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
- Silberverstärker Inten SE M (Initiator + Enhancer), Fa. Amersham,
- β -Mercaptoethanol, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Steriles Wasser, Tissue cultured tested, Fa. Gibco, Eggenstein, Deutschland
- T3 (L-3,3',5-Triiodo-Thyronine), Fa. Calbiochem, La Jolla, USA
- TEMED (Tetramethylethylendiamin) Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Texas red Avidin D, Fa. Vector, Burlingame, UK
- Trichloressigsäure, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Tris-HCl, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Tris-Hydroxymethylaminomethan, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton X-100, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Uranylacetat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ziegenserum, Fa. Vector, Burlingame, UK

Gebrauchslösungen

Puffer

- PBS (0,01 M): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,8 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 7,2 mM in Aqua bidest., pH 7,2; bei RT 2 Monate haltbar
- Phosphatpuffer (0,1 M): NaH_2PO_4 33 mM, Na_2HPO_4 67 mM in Aqua bidest., pH 7,4; bei RT 2 Monate haltbar

Stammlösungen für die Zellkultur

- Na-Selenit-Stammlösung: 10,4 mg Na-Selenit in 10 ml PBS, davon 100 µl in 10 ml PBS; bei -20°C ein Jahr haltbar
- Insulin-Stammlösung: 250 mg Insulin in 10 ml HCl (20 mM), bei -20°C ein Jahr haltbar
- T_3 -Stammlösung: 2 mg T_3 in 100 ml NaOH (10 mM), bei -20°C ein Jahr haltbar
- BSA-Stammlösung: 2 g BSA in 20 ml PBS, pH 7,0 (= BSA_{hi}), bei -20°C ein Jahr haltbar, davon 1 ml in 9 ml PBS (= BSA_{lo}), bei -20°C ein Jahr haltbar
- Aprotinin-Stammlösung: 10 mg Aprotinin in 10 ml PBS, bei -20°C ein Jahr haltbar
- Transferrin-Stammlösung: 500 mg Transferrin in 5 ml PBS, bei -20°C ein Jahr haltbar
- Hormon-Cocktail (aus den oben genannten Lösungen angesetzt): 2 ml BSA_{lo} , 2 ml Transferrin-Stammlösung, 2 ml Aprotinin-Stammlösung, 1 ml Na-Selenit-Stammlösung, 20 µl T_3 -Stammlösung, 800 µl Insulin-Stammlösung in 12,2 ml PBS, bei -20°C ein Jahr haltbar

Lösungen und Medien für die Zellkultur

- Kulturmedium: 1 ml BSA_{hi} , 1 ml Hormon-Cocktail, 250 mg Glucose (Anhydrat), 1 ml Na-Pyruvat in 100 ml BME, with Glutamax-I, pH 7,2; bei 4°C zwei Wochen haltbar
- Hanks'sche Salzlösung (modifiziert): 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 mM Glucose-monohydrat, 2,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,17 mM NaHCO_3 in Aqua bidest., pH 7,2; bei 4°C zwei Monate haltbar
- Zell-Ablösepuffer: 15 mM NaCl, 1 mM PIPES, 0,1 mM EDTA in Aqua bidest., pH 7,2; bei RT zwei Wochen haltbar

Lösungen für Proteinaufarbeitung, Elektrophorese und Westernblotting

- Elektrophoresepuffer: 3 g Tris-Base, 14,4 g Glycin, 1 g SDS in 1 l Aqua bidest., pH 8,3
- Probenladepuffer (3x): 62,5 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 10 % Saccharose, pH 6,8; bei RT zwei Monate haltbar
- Sammelgelpuffer: 500 mM Tris-Base, in Aqua bidest., pH 6,8; bei RT zwei Monate haltbar
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-Base in Aqua bidest., pH 8,8; bei RT zwei Monate haltbar
- Polyacrylamidgel: 7,5 % bzw. 10 % Acrylamid (37,5 %), 10 % SDS, 2 % APS, 10 % TEMED in Trenngelpuffer, pH 8,8; bei 4°C zwei Monate haltbar

Lösungen zur Fixierung von kultivierten Zellen

- Cacodylatpuffer (200 mM): 200 mM Cacodylsäure-Natriumsalz in Aqua bidest., pH 7,2; bei 4°C zwei Monate haltbar
- Paraformaldehydlösung (4 %): 4 g Paraformaldehyd in 100 ml Aqua bidest., pH 7,2

- Glutaraldehyd (1 %): 1ml Glutaraldehyd (70 %) in 70 ml Cacodylatpuffer, pH 7,2

Lösungen zur immunzytochemischen Analyse von Kulturen

- Antikörpervedünner: 0,5 % BSA, 0,05 % NaN_3 in PBS, pH 7,3; bei 4°C zwei Monate haltbar
- Triton X-100-Lösung: 0,5 % Triton X-100 in PBS
- Serum zum Blocken unspezifischer Bindungen: 2% Normalserum in PBS
- DAB-Stammlösung: 2,5 g DAB in 1 l Aqua bidest., bei -20°C ein Jahr haltbar
- DAB-Gebrauchslösung: 1 ml DAB-Stammlösung, 5 μl H_2O_2 in 4 ml PBS

Lösungen für die Elektronenmikroskopie

- PBS-A-Stock: 400 mg bovine serum albumine (BSA) in 20 ml PBS, pH 7,2; bei -20°C ein Jahr haltbar
- PBS-A-Gebrauchslösung: 10 % PBS-A-Stock in PBS, pH 7,2
- BSA-C-Stock: 2 g carboxymethylated BSA in 20 ml Aqua bidest., bei -20°C ein Jahr haltbar
- Tween20-Stock: 2 g Tween in 20 ml Aqua bidest., bei -20°C ein Jahr haltbar
- NaN_3 -Stock: 2 g NaN_3 in 20 ml Aqua bidest., bei -20°C ein Jahr haltbar
- Dilution für den zweiten Antikörper: 2 % goldmarkierter zweiter Antikörper, 1 % BSA-C-Stock, 1 % NaN_3 -Stock, 1 % Tween20-Stock in PBS
- PBS-Tween20-Waschlösung: 0,5 % Tween20-Stock in PBS
- NaNO_3 -Waschlösung: 10 % NaNO_3 -Stock (1,5 M) in Aqua bidest.
- Gummi arabicum-Stock: 1 GT Gum arabicum in 2 GT Aqua bidest. aufgelöst, bei -20°C zwei Jahre haltbar
- Goldchlorid-Stock: 0,1 g HAuCl_4 in 1 ml Aqua bidest., bei 4°C ein Jahr haltbar
- Acetatpufferstocklösung: 68,05 g $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO}^-)$ in 500 ml Aqua bidest., pH 5,6 mit Eisessig einstellen
- Acetatwaschpuffer: 1,5 ml Acetatpufferstock in 8,5 ml Aqua bidest., frisch angesetzt verwenden
- HEPES-Stocklösung: 4,76 g HEPES in 19 ml Aqua bidest., pH 7,4; bei -20°C ein Jahr haltbar
- HEPES-Waschlösung: 3 ml HEPES-Stocklösung in 7 ml Aqua bidest.
- Natriumthiosulfatpuffer: 1,25 g NaS_2O_3 , 1 ml HEPES-Stocklösung in 50 ml Aqua bidest., bei 4°C ein Jahr haltbar
- Silberverstärker: 1 ml Inten SE M Teil A (Initiator), 1 ml Inten SE M Teil B (Verstärker), 1 ml Gummi arabicum-Stocklösung
- Uranylacetatlösung: 2 ml Uranylacetat in 100 ml 70 % Alkohol, bei 4°C ein Jahr haltbar
- Eponmischung: 10,7 g Epon 812, 7,8 g DDSA, 6,5 g MNA, 0,5 g Epon-Accelerator mindestens 30 min. langsam verrühren
- Epon-Einbettung: 2 VT HPMA + 1VT Epon, 1 VT HPMA + 1 VT Epon, 1 VT HPMA + 2 VT Epon, reines Epon

- Osmium-Lösung: 1 % OsO₄ in PBS

Lösung für den Meerrettich-Peroxidase-Nachweis

- HRP-Lösung: 100 mg HRP in 10 ml Kulturmedium

Versuchstiere

Die Primärkulturen wurden mit Zellen von 17 Tage alten Mäuseembryonen angelegt. Dazu wurden männliche C3H/He-Mäuseböcke (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) 12 Stunden lang mit weiblichen C57B1/6J-Mäusen gepaart. Die Betreuung der Tiere erfolgte im zentralen Tierversuchsstall der Charité bzw. im Tierversuchsstall des Anatomischen Institutes der Charité. Die Tierzucht und alle weiteren Arbeiten mit den Mäusen wurden entsprechend den geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

Die primär dissoziierte hippocampale Zellkultur

Sämtliche Arbeitsschritte der Präparation, Kultivierung und Behandlung der Zellen wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Benötigte Medien und Medienzusätze wurden unter Verwendung von Einmalsterilfiltern mit 0,2 µm sterilfiltriert. Die Kulturen wurden nicht mit antibiotischen Substanzen behandelt.

Chirurgische Instrumentarien und Glaswaren wurden bei trockener Hitze von 180°C 30 min lang sterilisiert. Kunststoffgegenstände wurden bei feuchter Hitze von 121°C und einem Dampfdruck von 200 kPa 15 min lang autoklaviert.

Für das Anheftungs- und Überlebensverhalten der zu kultivierenden Zellen spielt die Oberfläche des Kulturgefäßes eine entscheidende Rolle. Zur Verbesserung der Oberflächeneigenschaften dient vor allem die Anreicherung elektrischer Ladungen. Dazu wurde der Boden der Kulturschalen mit Poly-D-Lysin oder Poly-L-Lysin beschichtet. Dies erfolgte durch Gabe von sterilen 2 %igen Poly-D-Lysin- und Poly-L-Lysin-Lösungen in die Kulturschälchen für 24 h bei RT. Nach anschließendem dreimaligen Spülen mit Aqua bidest. wurden die Kulturschälchen in der Sterilwerkbank bei RT getrocknet. In Vorversuchen ergab sich kein Anhalt für unterschiedliches Anheftungs- und Differenzierungsverhalten der hippocampalen Zellen auf Poly-D-Lysin/ bzw. Poly-L-Lysin-Beschichtung, so daß für alle Experimente einheitlich Poly-D-Lysin-beschichtete Kulturgefäße verwandt wurden. Die schwangeren Muttertiere wurden mit Chloroform narkotisiert, durch zervikale Dislokation getötet und der Uterus entnommen. Die weitere Präparation erfolgte in einer sterilen Petrischale auf Eis in einer Sterilwerkbank. Die Embryonen wurden aus dem Uterus entfernt und sofort dekapitiert. Die Köpfe wurden umgehend in modifizierter Hanks'scher Lösung (pH 7,2) auf Eis gestellt.

Unter Zuhilfenahme einer Stereolupe wurde die Schädelhaut entfernt, die Kalotte eröffnet und das Gehirn entnommen. Danach wurden die Meningen mit einer feinen Pinzette vom Gehirn abgetrennt. Anschließend wurde der Hippocampus mit dem Gyrus dentatus entnommen. Die gesamte Präparation erfolgte in PBS auf Eis. Die Hippocampi wurden zunächst in modifizierter Hanks'scher Salzlösung auf Eis gesammelt.

Nach mechanischer Zerkleinerung wurden die Zellen neun Minuten (1.500U/min) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert. Die Dichte betrug 20.000 Zellen/cm² bzw. 5.000 Zellen/cm² für die Versuche, die zur Längenmessung herangezogen wurden.

Die Zellen wurden anschließend bei 37°C und 10 % CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Nach 48 h in Kultur (2 DIV = 2 *days in vitro*) wurde das Medium komplett durch frisches Medium ohne Serumzusatz ersetzt. Während der weiteren Kultivierung erfolgte das Füttern der Zellen wöchentlich, wobei jeweils die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ohne Serumzusatz ersetzt wurde.

Proteinnachweis mittels Westernblotverfahren

Die Zellen wurden durch Probenladepuffer vom Boden des Kulturschälchens abgelöst. und dann ca. 1 min mittels Ultraschall homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat für 5 min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Aus dem proteinhaltigen Überstand wurde eine Probe zur Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen. Der verbleibende Überstand wurde mit Bromphenolblau versetzt und 5 min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch, wobei als Standard BSA diente.

Die endgültige Proteinkonzentration wurde durch Zugabe von Probenladepuffer auf 20 µg/µl eingestellt. Jeweils 10 µl dieser Proben wurden pro Geltasche aufgetragen und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in der Midget-Kammer aufgetrennt. Dazu wurden Gele von 7,5 % - 10 % verwandt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mittels des Westernblot-Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Detektierung der Proteine erfolgte durch die in Tabelle 1 aufgeführten Primärantikörper, die durch HRP- (Meerrettichperoxidase) gekoppelte Sekundärantikörper und DAB-Entwicklung visualisiert wurden.

Tabelle 1: Arbeitskonzentrationen der Primärantikörper beim Westernblotverfahren

Antikörper	Eigenschaft	Verdünnung
anti-Synaptophysin	polyklonal, Kaninchen	1:2000
anti-Synaptobrevin	monoklonal, clone 69.1, Maus	1:3000
PKC α	monoklonal, Maus	1:1000
anti-Syntaxin	monoklonal, clone HPC-1, Maus	1:2000
anti-SNAP-25	monoklonal, Maus	1:3000

PKC α = Proteinkinase C α

Nachweis von Proteinen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene

Die verschiedenen immunzytochemischen Nachweismethoden basieren alle auf dem folgenden Grundprinzip. Das gesuchte Antigen wird durch einen spezifischen Primärantikörper erkannt. Dieser wird entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörper nachgewiesen, oder durch ein an einen Sekundärantikörper gebundenes Avidin-Biotin-System, über das ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff bzw. ein chromogenes Enzym anheften kann.

Die Avidin/Biotin-Methode

Zunächst wurde mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig das Medium aus den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen in 0,5 ml 4 %iger Paraformaldehydlösung für 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurde das Fixans durch dreimaliges Spülen à 5 min mit PBS entfernt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Kulturen bei RT in einer Lösung aus 10 %igem Methanol und 0,1 %igem H₂O₂ in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte wieder ein Waschgang mit PBS. Um ein besseres Eindringen der Antikörper in intrazelluläre Kompartimente zu ermöglichen, wurden die Zellmembranen der kultivierten Neurone für 5 min in 0,5 % Triton X-100 in PBS bei RT permeabilisiert. Danach wurden die Kulturen in einer 2 %igen Normalserum-Lösung der Spezies, in der der Sekundärantikörper hergestellt wurde, inkubiert. Das verhindert ein Zustandekommen falsch-positiver Ergebnisse durch unspezifische Antikörperbindungen. Dann erfolgte ohne vorhergehenden Waschgang die Inkubation mit dem Primärantikörper (über Nacht, bei 4°C; zu Konzentrationen siehe Tabelle 2). Nach Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1 h, bei

4°C; zu Konzentrationen siehe Tabelle 3). Nach abermaligem Waschen schloß sich die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC) oder einem HRP-gekoppelten Antikörper an.

Tabelle 2: Konzentrationen der zytochemisch verwandten Primärantikörper

Antikörper	Eigenschaft	Verdünnung
anti-Synaptophysin	polyklonal, Kaninchen	1:1000
	monoklonal, clone SY38, Maus	1:20
anti-SNAP-25	monoklonal, Maus	1:1000
	polyklonal, Kaninchen	1:200
anti-MAP-2	monoklonal, Maus	1:200
anti-Transferrin	polyklonal, Kaninchen	1:500

Tabelle 3: Konzentrationen der verwandten Sekundärantikörper

Antikörper	Eigenschaft / Herkunft	Verdünnung
biotinyl. anti-Maus	Pferd	1:200
biotinyl. anti-Kaninchen	Ziege	1:200
FITC	chromogen, Ziege-anti-Kaninchen	1:750

Zur enzymatischen Umsetzung des Chromogens wurden die Zellen in einer Lösung aus 0,05 % DAB (Diaminobenzidin), und 0,03 % H₂O₂ in Tris-HCl inkubiert, wobei sich die Entwicklungsdauer nach Stärke der Immunreaktion richtete und unter dem Mikroskop kontrolliert wurde.

Sämtliche Schritte dieser immunzytochemischen Nachweismethode erfolgten direkt in den Kulturschalen. Die Antikörper wurden in einer Antikörper-Verdüner-Lösung angesetzt, der AB-Komplex entsprechend den Empfehlungen des Herstellers 1:100 in PBS verdünnt. Abschließend wurden die Kulturschalenböden mit einem Hohlbohrer ausgebohrt, und die fertigen Präparate mit Kaisers-Glycerin-Gelatine eingedeckt.

Der Fluoreszenznachweis von Proteinen in der Zellkultur

Analog dem Vorgehen bei der Avidin-Biotin-Methode erfolgte zunächst eine Fixierung der Zellkulturen in 4 %igem Paraformaldehyd bei RT, ein Permeabilisieren der Zellmembranen für 5 min mit 0,3 % Triton X-100 bei RT, unterbrochen durch Waschen in PBS. Als nächstes erfolgte die Inkubation der Zellen in 2 %igem Normalserum der Spezies des Sekundärantikörpers. Nach dem Absaugen dieses Serums folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (über Nacht, bei 4°C). Mittels zweier verschiedener Sekundärantikörper, des Fluorescein-markierten Zweitantikörpers (FITC-anti-rabbit) und des Biotin-konjugierten Zweitantikörpers (biotinyl. anti-mouse), der durch Anlagerung TexasRot-angereicherter Avidinmoleküle sichtbar wurde, waren Doppelmarkierungen möglich. Nach dreimaligem Spülen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper und/oder dem FITC-Antikörper (1 h, bei 4°C). Ab diesem Zeitpunkt mußte in einer abgedunkelten Kammer gearbeitet werden, um ein frühzeitiges Verblässen der Fluoreszenzen zu vermeiden.

Nach erneutem Spülen mit PBS erfolgte die Visualisierung des Biotin-markierten Sekundärantikörpers mit TexasRot-konjugiertem Avidin. Durch Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen (TexasRot: Emission bei 615 nm und Extinktion bei 595 nm; FITC: Emission bei 512 nm und Extinktion bei 492 nm) wurden die Vesikelpoteine sichtbar. Die Kontrolle mit Sekundärantikörpern (ohne Primärantikörper) zeigte eine schwache, diffuse Hintergrundfärbung.

Um eine Konservierung der Fluoreszenzen zu gewährleisten, wurden diese nach dem Ausbohren mittels Hohlbohrer in ImmunoMount (Fa. Shandon) eingedeckt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Pre-embedding-Methode für die elektronenmikroskopische Aufarbeitung

Zur Darstellung der Ultrastrukturen mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurde eine Pre-embedding-Methode mit Gold/Silber-Verstärkung genutzt. Die Fixierung der Neurone in den Zellkulturschalen erfolgte durch 1,5 %iges Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer für 30 min. bei RT. Die endogene Peroxidase wurde durch 10 %iges Methanol und 10 µl H₂O₂ in 10 ml PBS blockiert (5 min), anschließend erfolgte eine Permeabilisierung in 0,5 mg Saponin/ml HBSS (10 min). Die Vorinkubation fand in 2 %igem Ziegen Serum statt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils dreimal in PBS gewaschen. Die Inkubation in der Lösung des Primärantikörpers erfolgte für 24 h bei 4°C. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde wiederum in PBS gewaschen und 30 min in einer 10 %igen PBS-A-Lösung vorinkubiert.

Der goldmarkierte Zweitantikörper (1 nm Gold) wurde 1:50 in einer Lösung aus BSA/C, Tween 20, Natriumazid und PBS verdünnt. Nach der Inkubation für 24 h bei 4°C wurde in 0,05 %igem PBS-Tween (20 min und 40 min) und PBS (60 min) gewaschen und anschließend mit 2 %igem Glutaraldehyd für 15 min nachfixiert. Nach Spülungen mit PBS und 150 mM NaNO₃ wurde für 30-60 min unter Sichtkontrolle der Silberverstärker (Inten SE M, Fa. Amersham) dazugegeben und der Abbruch mit 150 mM NaNO₃ erzeugt.

Dann wurde im Kühlraum mit 5 mM Goldchlorid, Acetat-Waschpuffer, Natriumthio-sulfat-Puffer, HEPES-Waschpuffer und PBS gespült. Bei RT wurde mit 1 %igem OsO₄ kontrastiert. Nach 25 min wurde je dreimal in 50 %igem und 70 %igem Alkohol gespült, dann mit 2 %igem Uranylacetat für 10 min bei 4°C nachkontrastiert. Die vollständige Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe, die Einbettung in vier Schritten mit steigender Epon 812-Konzentration. Für je 15 min wurden Mischungen aus 2 Volumenteilen (VT) HPMA + 1VT Epon, dann je 1 VT HPMA und Epon und 1 VT HPMA + 2 VT auf die Kulturen gegeben. Zuletzt wurde reines Epon auf die Zellkulturen gegeben.

Bei 60°C polymerisierte Epon aus, anschließend wurden die eingebetteten Zellen von ihrer Unterlage abgesprengt. Nach Trimmen mit einer Rasierklinge wurden an einem Ultramikrotom Semi- und Ultra-Dünnschnitte angefertigt, die auf Zaponlack-befilmte Nickelgrids aufgezogen wurden. Anschließend erfolgte eine Nachkontrastierung für 3 min mit Natriumcitrat-Lösung, dann weitere 3 min mit Uranylacetat-Lösung.

Photographische Dokumentation

Die kultivierten Zellen wurden lichtmikroskopisch mit dem inversen Mikroskop (Axioplan, Fa. Zeiss) ausgewertet. Der Dokumentation der Ergebnisse diente der integrierte Photoaufsatz (Ricoh). Dabei wurden Pan Ilford-Filme (schwarz/weiß Negativfilm, 50 ASA) verwandt. Fluoreszenzpräparate wurden an dem Mikroskop BX50 der Firma Olympus mit der Photosteereinheit PM-20 und dem Apparat PM-C 35 DX fotografiert. Die Anregung der Farbstoffe erfolgte mit einer Quecksilberdampflampe und den Olympus-Filtern U-MNIBA (Anregung von 470-490 nm, dichroitische Teilung bei 505 nm, Sperrfilter von 515-550 nm) für FITC und U-MWIG (Anregung von 520-550 nm, dichroitische Teilung bei 565 nm, Sperrfilter von > 580 nm) für CY-3. Für die gleichzeitige Anregung beider Fluoreszenzfarbstoffe wurde das Mischfilter U-M51004 (Anregung von 480-495 nm sowie 550-570 nm, Sperrfilter von 515-535 nm und 590-620 nm) genutzt. Photographiert wurde auf Kodak Elite - Film (Diafilm, 1600 ASA). Bei der CLSM-Technik (confocal laser scanning microscopy) werden die mikroskopischen Bilder (Diaphot, Nikon; Anregung durch Argonlaser bei 514 nm, Emission für Fluorescein bei 540 nm und für TexasRot bei 600 nm) unter Verwendung eines

Scanners (MRC-600, BioRad, Hemel Hempstead, UK) in eine Computerdatei umgewandelt. In dieser Datei können Kolokalisationen errechnet und in einem dritten Farbton dargestellt werden. Die ultrastrukturellen Aufnahmen wurden an einem Transelektronenmikroskop (EM 900) der Firma Zeiss gemacht.

Morphometrische Messungen

Zur Ermittlung von Axon- und Dendritenlängen wurde das halbautomatische Bildanalysesystem „Videoplan“ der Firma KONTRON-Elektronik (Eching, Deutschland) genutzt. An fotografierten Zellkulturneuronen konnten so Dendritenanzahl, Anzahl der Dendriten- und Axonverzweigungen sowie die Längen der Fortsätze gemessen werden. Die erhaltenen Daten wurden in MS-Excel aufbereitet und anschließend statistisch ausgewertet. Für die Stichprobenvergleiche wurde der U-Test nach Mann und Whitney bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ verwandt.

Ergebnisse

Unter Anwendung morphologischer Kriterien und der immunzytochemischen Identifizierung von Neuronen und deren Kompartimenten wurde zunächst die neuronale Entwicklung in der hippocampalen Zellkultur charakterisiert.

Die neuronale Entwicklung in der primär dissoziierten hippocampalen Zellkultur

Der Hippocampus gehört als Teil des Archicortex zu den bestuntersuchten Regionen des Gehirns. Durch seine begrenzte Zahl von Neuronentypen und deren bekannte Vernetzung eignet er sich besonders als Modellsystem für die Zellkultivierung.

Bei der mechanischen Dissoziation der Hippocampi zu Einzelzellen kommt es zum Abreißen aller vorhandenen Zellfortsätze, so daß bei der Aussaat in die Kulturschalen eine Suspension unterschiedlich großer, fortsatzloser, abgerundeter Zellen vorhanden ist. Neben Glia- und Bindegewebszellen kommen hauptsächlich die zwei neuronalen Zelltypen, Pyramidenneurone und Körnerzellen, vor.

Bereits nach einem Tag in der Kultur (1 Tag *in vitro* = 1 *day in vitro* = 1 DIV) kann man die Zellen unterscheiden. So ist für die Pyramidenneurone ein pyramidenartig geformtes, im Durchmesser zunächst ca. 7-12 µm großes Perikaryon charakteristisch. Die Körnerzellen erscheinen mit anfangs durchschnittlich 5-8 µm im Durchmesser deutlich kleiner. Ihr Zellkörper weist eine eher runde Form auf. Die Zellen beginnen sofort nach Aussaat mit der Ausbildung mehrerer kleiner Fortsätze. Zum Teil ist dabei schon nach einem Tag in der Kultur die Differenzierung eines dieser Fortsätze in das Axon zu erkennen, das länger als die dendritischen Fortsätze ist. Nach zwei Tagen sind alle Zellen deutlich polarisiert, es lassen sich Dendriten und Axone voneinander unterscheiden. Letztere sind länger und wachsen zu diesem Zeitpunkt bis zu fünfmal schneller als die Dendriten (Dotti 1988). Auffällig sind am distalen Axonende Auftreibungen, die Wachstumskolben.



Abbildung 3: Pyramidenzelle nach 1 DIV

Nach 24 h in der Kultur sind die neu ausgebildeten Fortsätze deutlich zu erkennen. Dabei ist das Axon (Ax) deutlich länger als die dendritischen (D) Fortsätze. PN = Pyramidenneuron, anti-MAP-2-Markierung, DAB-Entwicklung und Phasenkontrast Maßstab = 10 µm

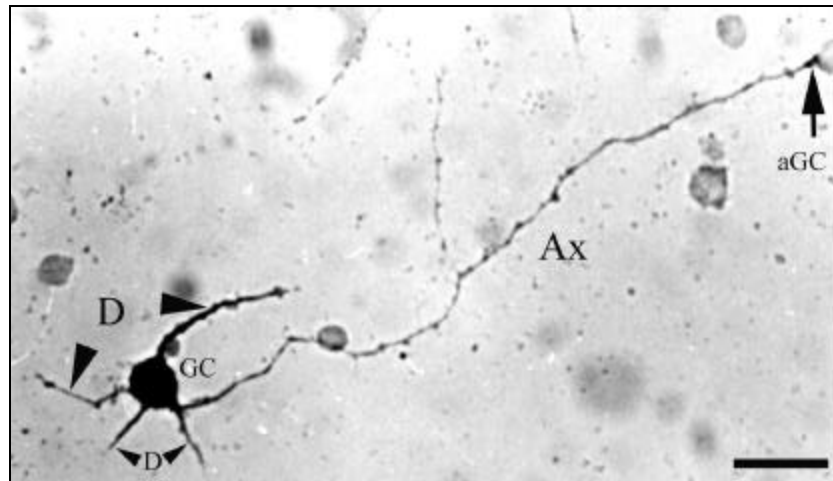


Abbildung 4: Körnerzelle nach 2 DIV

Die 2 Tage alte Körnerzelle (GC) ist deutlich polarisiert – das Axon (Ax) ist von den kurzen Dendriten (D) zu unterscheiden. Am Axon ist die aufgetriebene Wachstumszone (aGC) zu erkennen. anti-MAP-2-Markierung, DAB-Entwicklung und Phasenkontrast Maßstab = 15 µm

Nach drei Tagen (3 DIV) in der Kultur lassen sich Anhäufungen synaptischer Vesikel erkennen. Diese sind durch Antikörper gegen synaptische Vesikelproteine markiert worden. In der Abbildung 5 wurde das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin detektiert. Man erkennt die Anhäufungen der synaptischen Vesikel als punktuelle Immunreaktionen. Die intensive Immunreaktion im Zelleib weist auf die Synthese der synaptischen Vesikelproteine hin. Das Erreichen intrazellulärer Antigene wird den Antikörpern dabei durch die Permeabilisierung der Zellmembranen mit Triton X-100 ermöglicht. Das schnelle Axonwachstum setzt sich fort, während die Entwicklung der Dendriten deutlich langsamer voranschreitet.

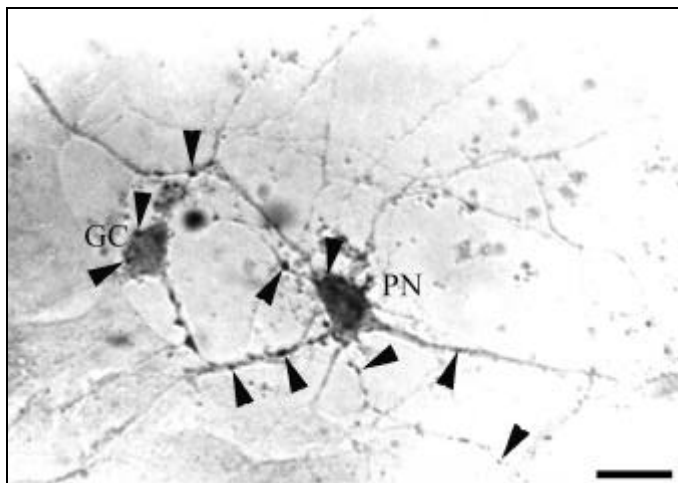


Abbildung 5: Die hippocampale Zellkultur nach 3 DIV

Immunmarkierung des synaptischen Vesikelproteins Synaptophysin. Die punktuellen Reaktionen (Pfeilspitzen) deuten auf erste Anhäufungen synaptischer Vesikelproteine hin. Ax = Axon, D = Dendriten, PN = Pyramidenzelle, GC = Körnerzelle, DAB-Entwicklung und Phasenkontrast

Maßstab = 20 µm

Bei sechs Tagen alten Kulturen (Abbildung 6) sind zahlreiche Nervenzellfortsätze zu erkennen. Am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) kann man Kollokalisierungen von MAP-2 und Synaptophysin als gelbe Punkte darstellen.

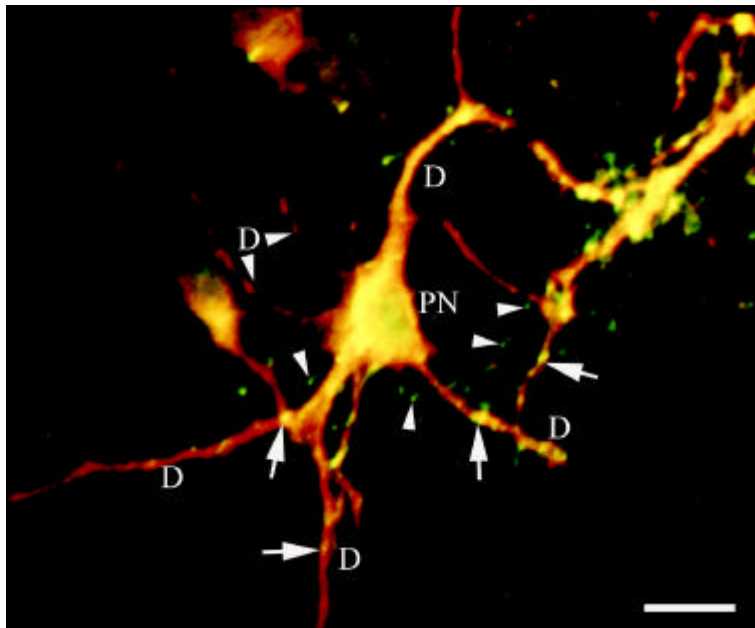


Abbildung 6: Sechs Tage
altes Pyramidenneuron

An der abgebildeten Zelle erfolgte eine Doppelimmunfluoreszenzdetektion mit anti-Synaptophysin (grün) und anti-MAP-2 (rot). Die Pfeile zeigen axo-dendritische Synapsen (gelb). Der Zelleib ist durch die Proteinsynthese stark angefärbt. Die punktuellen Synaptophysin - Detektionen (Pfeilspitzen) zeigen den axonalen Transport dieses Proteins. PN = Pyramidenzelle, D = Dendrit

Maßstab = 15 μ m

Im Zelleib werden beide Proteine im rauen ER synthetisiert und über den Golgi-Apparat sortiert. Die Dendriten werden durch die MAP-2 - Färbung identifiziert. Die punktförmigen Immunfluoreszenzen für Synaptophysin zeigen den axonalen Transport dieses Proteins. An der dendritischen Plasmamembran sind einige Synapsen zu erkennen.

Nach 6 DIV sind im elektronenmikroskopischen Bild große Zellkerne und ein organellenreiches Zytoplasma zu erkennen. Der Golgi-Apparat ist bereits gut differenziert und in enger Nachbarschaft mit zahlreichen, großen Mitochondrien und rauhem ER. In Anschwellungen der z.T. schon parallel gebündelten Axone sind Anhäufungen synaptischer Vesikel und in den Endigungen von Körnerzellaxonen typischerweise Large Dense Core Vesicles (LDCV) nachweisbar (Abb. 7-11).

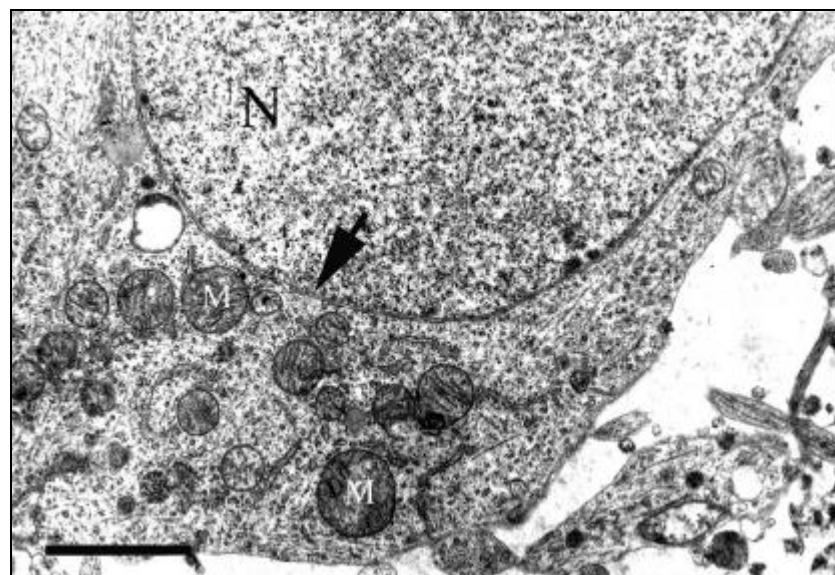


Abbildung 7: Ultrastruktur der neuronalen Somata nach 6 DIV

Im Zellkern (N) ist das Chromatin fein dispers verteilt. Die Kernmembran besteht aus zwei Lamellen (Pfeil). PN = Pyramidenneuron, M = Mitochondrien

Maßstab = 1 μ m

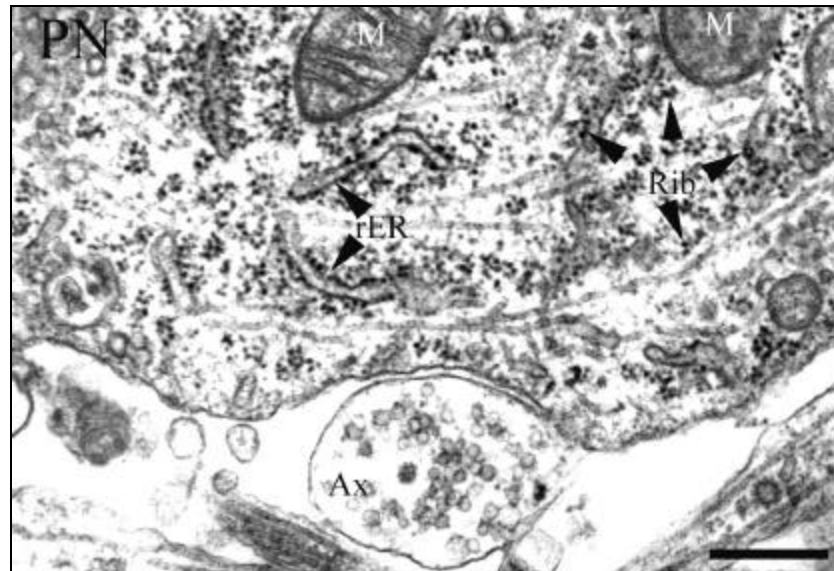


Abbildung 8: Ultrastruktur eines Neurons nach 6 DIV

In Kernnähe sind viele Ribosomen (Rib) und ribosomenbesetztes Endoplasmatisches Retikulum (rER) zu erkennen. Das quer angeschnittene Axon (Ax) ist mit synaptischen Vesikeln angefüllt. Maßstab = 0,25 μm

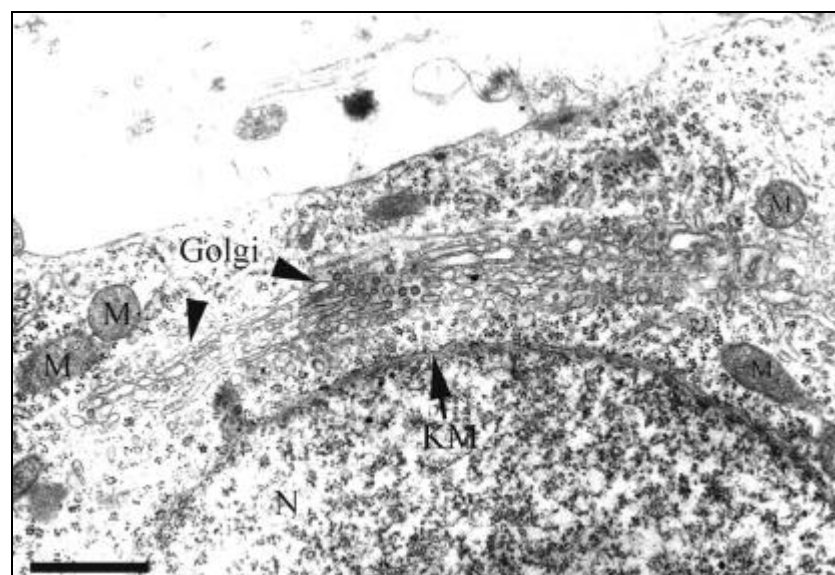


Abbildung 9: Ultrastruktur eines Neurons nach 6 DIV

Der Golgi-Apparat ist bereits gut differenziert und steht in enger räumlicher Beziehung mit Mitochondrien (M). KM = Kernmembran; N = Nucleus
Maßstab = 0,5 μm

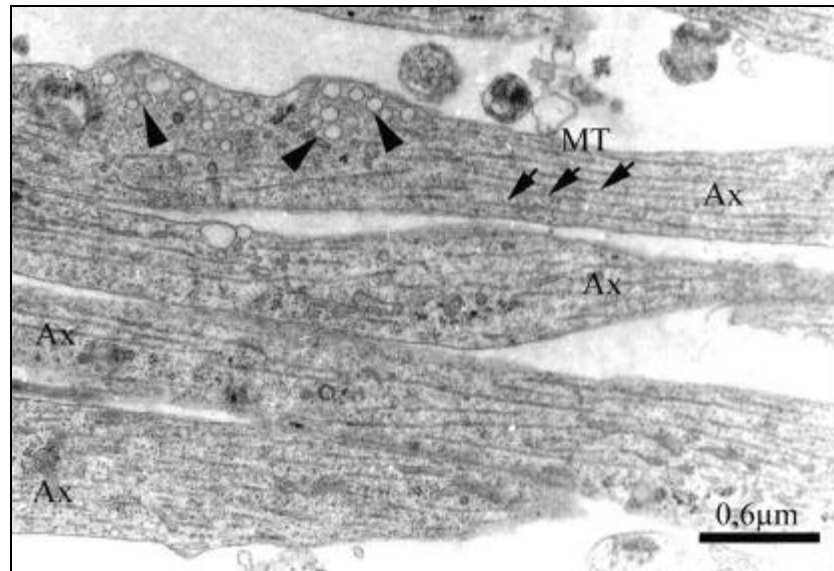


Abbildung 10: Ultrastruktur von Axonen nach 6 DIV

Die vier Axone (Ax) sind bereits gebündelt. Sie enthalten Wachstumsvesikel (Pfeilspitzen) und parallel angeordnete Mikrotubuli (MT). Maßstab = 0,6 μm



Abbildung 11: Ultrastruktur des Axons einer Körnerzelle nach 6 DIV

Die Axonvarikosität der sechs Tage alten Körnerzelle ist mit Large Dense Core Vesicles (LDCV) und synaptischen Vesikeln (SV) angefüllt. D = Dendrit, Ax = Axon
Maßstab = 1 μm

Nach 11 DIV ist das morphologische Bild der Zellkulturen gegenüber 6 - 8 DIV verändert. Man findet ein dichteres Fasernetzwerk mit vielen Synapsen vor. Die Perikarya zeigen kaum noch Immunreaktion gegen synaptische Vesikelproteine (Abbildung 12). Die punktförmige Verteilung der Vesikelproteine zeigt die zunehmende Anreicherung in Präsynapsen, was die ultrastrukturelle Darstellung in Abbildung 13 erkennen läßt.

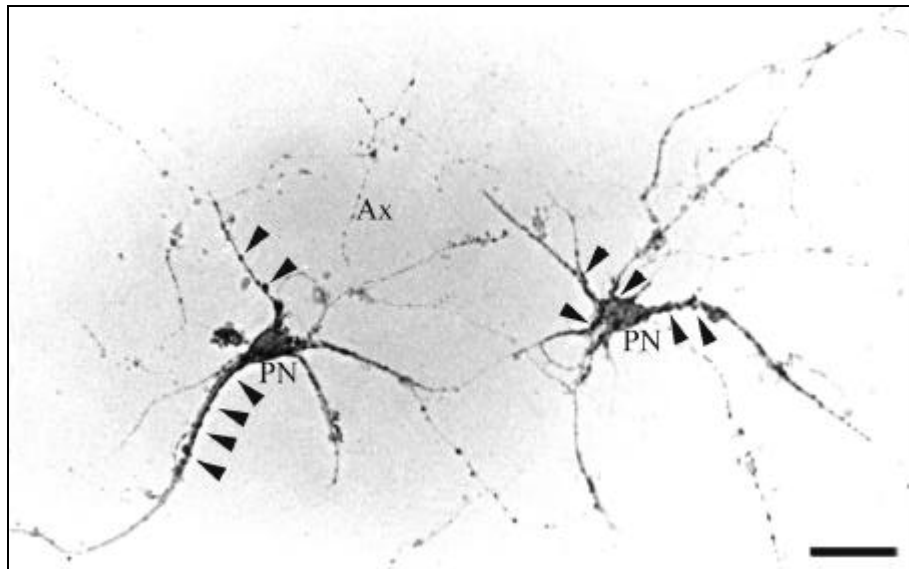


Abbildung 12: Hippocampusneurone nach 11 Tagen Kultivierung

Wie die punktförmigen Immunreaktionen (Pfeilspitzen) entlang der Fortsätze und Zellkörper zeigen, hat sich eine Vielzahl synaptischer Kontakte entwickelt. Dichte Aufreihungen ergeben dabei ein perlschnurartiges Bild. PN = Pyramidenzelle, Ax = Axon, D = Dendrit, anti-Synaptophysin-Markierung, DAB-Entwicklung
Maßstab = 30 µm

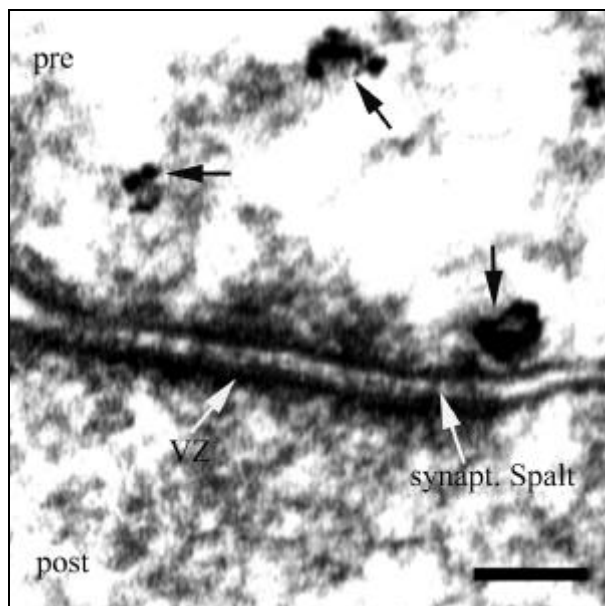


Abbildung 13: Ultrastruktur einer Synapse nach 11 DIV

In diesem elektronenmikroskopischen Bild sind Prä- (pre) und Postsynapse (post) mit postsynaptischer Verdichtungszone (VZ) zu erkennen. Syntaxin ist in synaptischen Vesikeln markiert (schwarze Pfeile). Pre-embedding-Methode, Gold/Silber

Maßstab = 0,10 µm

Nach 20 DIV haben die Zellen noch längere Fortsätze und mehr Synapsen gebildet. Die Abbildung 14 zeigt eine Doppelimmundetektion von Synaptophysin und MAP-2. Gelbe punktförmige Markierungen an den Dendriten und am Perikaryon zeigen Synaptophysin in Synapsen.

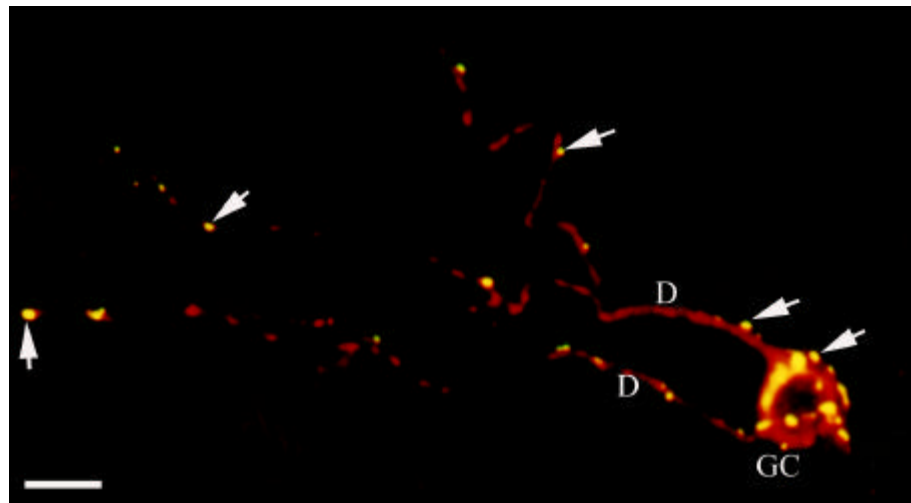


Abbildung 14: 20 Tage alte Körnerzelle

Synaptophysin ist in synaptischen Strukturen angereichert. Die Pfeile zeigen axo-dendritische und axo-somatische Synapsen. Die MAP-2 - Detektion (rot) ermöglicht die Dendritenidentifizierung. GC = Körnerzelle, D = Dendrit, CLSM
Maßstab = 20 µm

Nach 20 DIV und in älteren Kulturen sind im elektronenmikroskopischen Bild Moosfaserboutons zu erkennen (Abbildung 15), die als unmyelinisierte Axone hippocampaler Körnerzellen an den Spines proximaler Dendriten von Pyramidenneuronen enden. Außer synaptischen Kontakten bilden sich auch Puncta adhaerentia zwischen Dendritenschaft und Moosfaserbouton. Die Moosfaserboutons haben einen Durchmesser von 3-5 µm und sind mit großen Mitochondrien, LDCV und synaptischen Vesikeln (Abbildung 15) angereichert. Sie entsprechen im morphologischen Bild den *in vivo* beobachteten Moosfaserboutons. Die Anreicherung von Meerrettichperoxidase (HRP) in vesikulären Strukturen der Boutons zeigt die endozytotische Aktivität. In Abbildung 16 ist im Gegensatz zu den unmyelinisierten Körnerzellaxonen die Myelinisierung anderer Axone zu erkennen.

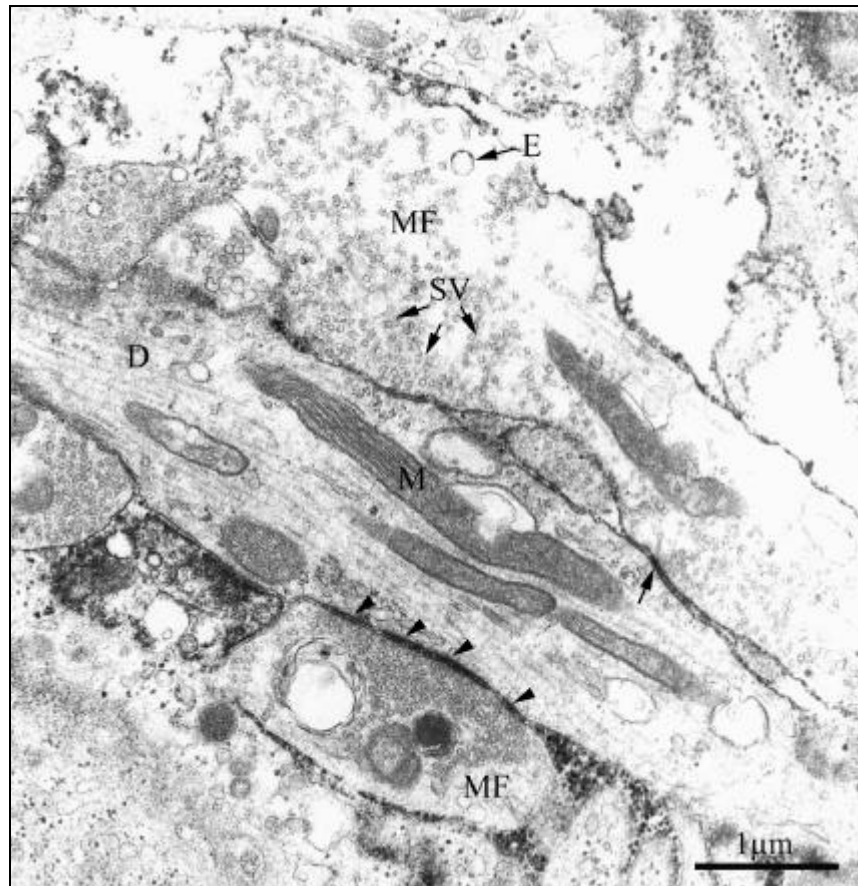


Abbildung 15: Hippocampale Moosfaserboutons nach 32 DIV

Moosfaserboutons (MF) lagern sich an einen apikalen Dendriten (D) einer Pyramidenzelle an, der durch seine Größe gut zu identifizieren ist. Die Moosfasern sind mit synaptischen Vesikeln (SV) und Mitochondrien (M) angefüllt. An den Kontaktzonen sind Puncta adherentia (Pfeilspitzen) und synaptische Aktivzonen (Pfeil) ausgebildet. E = Endosom
Maßstab = 1 μm

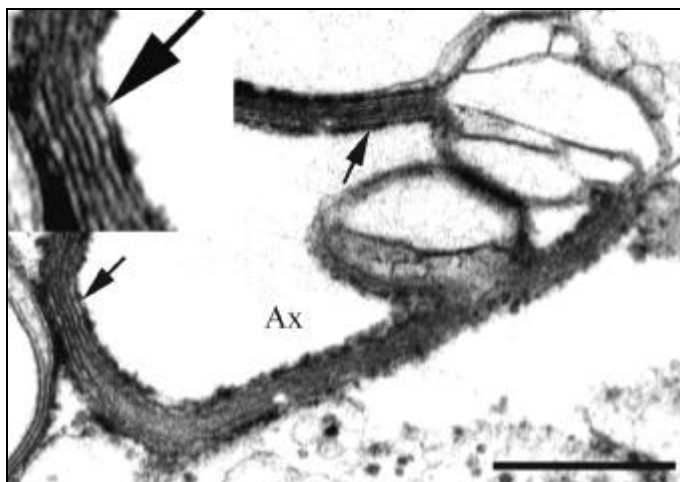


Abbildung 16: Myelinscheide nach 32 DIV

Ultrastrukturelle Darstellung einer Myelinscheide. In diesem Querschnitt sind deutlich die einzelnen Myelinlaminae (Pfeil) zu erkennen. Ax = Axon

Maßstab = 0,5 μm

Zelluläre Verteilung von SNAP-25 im lichtmikroskopischen Bild

Schon nach 2 DIV ist SNAP-25 in den neuronalen Zellen zu finden. Es ist zu diesem Zeitpunkt überwiegend im Soma der Zelle, aber auch in den Fortsätzen lokalisiert. Nach 3 DIV (Abbildung 17) sind die Immunmarkierungen im Perikaryon bereits gut lokalisierbar. SNAP-25 wird dort vor allem im rauen Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat, in dem synthetisierte Moleküle sortiert werden, detektiert. In allen Zellfortsätzen gelingt die Darstellung von SNAP-25. Daneben sind erste punktuelle Immunreaktionen zu erkennen, die auf Anhäufungen in präsynaptischen Strukturen hinweisen.

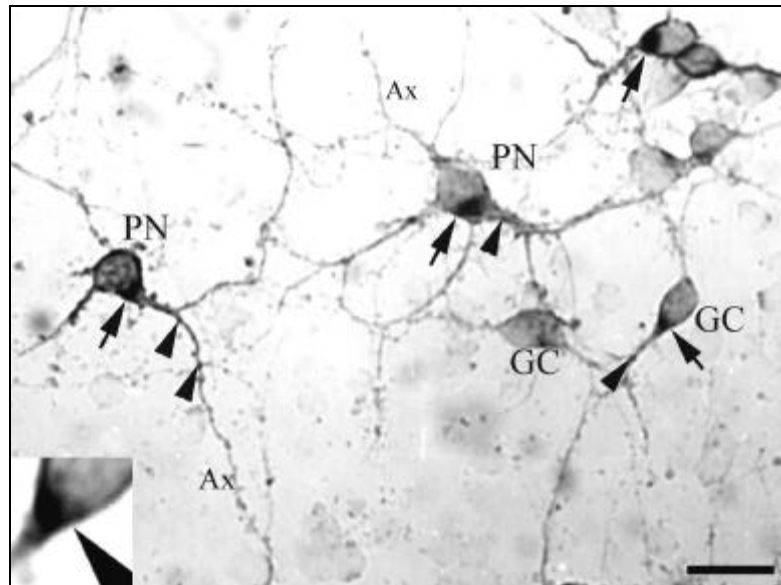


Abbildung 17: Vorkommen von SNAP-25 nach 23 DIV

Nach 3 DIV ist SNAP-25 im Perikaryon lokalisiert – es zeigt sich das typische Bild der perinukleären Kappe (Pfeile und Ausschnitt). Daneben ist das Protein in Axonen und Dendriten immundetektiert (Pfeilspitzen). DAB-Entwicklung, PN = Pyramidenzelle, GC = Körnerzelle, Ax = Axon, D = Dendrit

Maßstab = 20 μ m

Nach 6 DIV ist SNAP-25 im Perikaryon und allen Fortsätzen nachweisbar. Die Abbildung 18 zeigt SNAP-25 als perinukleäre Kappe, was Proteinbiosynthese und Sortierung im Golgi-Apparat und rauen Endoplasmatischen Retikulum entspricht. Auch Axone und Dendriten lassen Immunmarkierungen für SNAP-25 erkennen. Punktuelle Immunreaktionen weisen auf Synapsen hin.

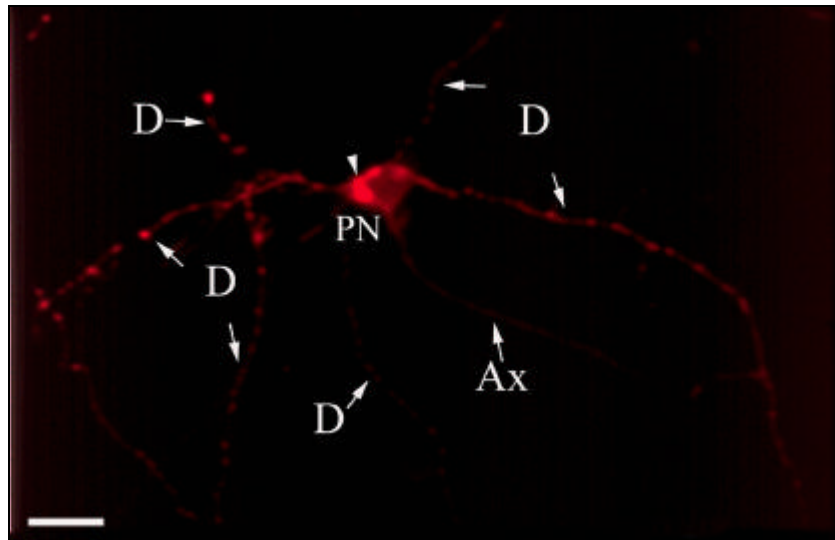


Abbildung 18: Verteilung von SNAP-25 nach 6 DIV

Punktuelle Immunreaktionen entlang der Zellfortsätze zeigen die Anreicherung in Synapsen. Das an Perlschnurketten erinnernde Bild erweist sich ultrastrukturell als Anhäufung vieler Synapsen. Im Soma ist die perinukleäre Kappe (Pfeilspitze) zu erkennen. PN = Pyramidenzelle, A = Axon, D = Dendrit
Maßstab = 20 µm

Wurde bisher SNAP-25 vor allem in den Axonen neuronaler Zellen beschrieben (Duc1995; Garcia1995), konnte in unseren Experimenten das Protein auch in Dendriten nachgewiesen werden (Abbildung 17 und Abbildung 18). Die Doppelmarkierungen von SNAP-25 und typischen Dendritenmarkern, wie MAP-2 und Transferrinrezeptor (Caceres1984; DeCamilli1984; Cameron1991), haben das bestätigt. Wie die Abb. 19 und 20 zeigen, ist eine Anreicherung von SNAP-25 in Zellfortsätzen zu sehen, die durch die Doppelmarkierung mit anti-Transferrinrezeptor-Immunglobulinen als Dendriten zu identifizieren sind. Das Axon bleibt bei der Immunmarkierung des Transferrinrezeptors ausgespart, während es sich mit SNAP-25 (Abbildung 19) darstellen läßt.

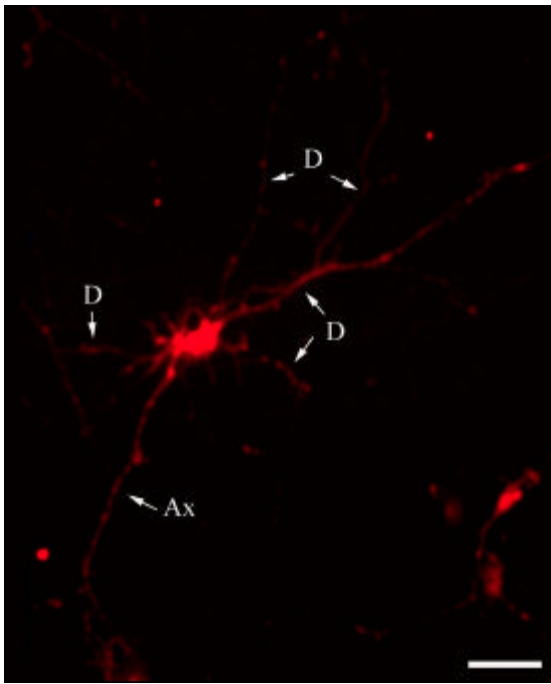


Abbildung 19: SNAP-25 nach 6 DIV

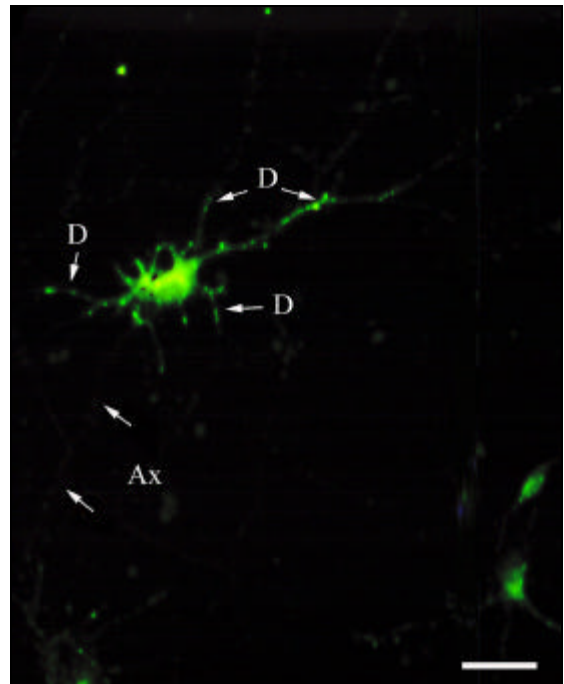


Abbildung 20: Transferrinrezeptor nach 6 DIV

Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen SNAP-25 (Abbildung 19) und Transferrinrezeptoren (Abbildung 20). Deutlich sichtbar ist die SNAP-25-Anreicherung in Fortsätzen, die in Abbildung 20 als Dendriten (D) identifiziert werden können. Der Antikörper gegen den Transferrinrezeptor markiert nicht das Axon (Ax). Maßstab = 20 µm

Die Doppelmarkierung von SNAP-25 und MAP-2 ergibt ein ähnliches Bild. Für SNAP-25 sind Immunreaktionen in Fortsätzen zu erkennen, die durch die Doppelmarkierung mit dem Antikörper gegen MAP-2 als Dendriten detektiert werden (nicht gezeigt).

Bei 11 Tage alten Kulturen ist in den Perikarya kaum noch SNAP-25-Immunreaktivität zu sehen, bedeutend mehr ist in Fasern detektiert worden. Wie in den Doppelfluoreszenzen von SNAP-25 und Synaptophysin (Abbildung 21 und Abbildung 22) zu sehen, überwiegen entsprechend der zunehmenden Synapsenbildung punktuelle Immunreaktionen. Die Fortsätze in dem dichten Netzwerk sind nicht mehr einer Zelle zuzuordnen. Die Zelleiber sind nur schwach immunreaktiv, d.h. die SNAP-25-Synthese ist stark zurückgegangen. Die Perikarya werden durch punktuelle Immunreaktionen entlang ihrer Oberfläche markiert. Diese entsprechen axo-somatischen Synapsen. Im Gegensatz zu Synaptophysin ist SNAP-25 in den Fortsätzen auch außerhalb von Synapsen detektiert.

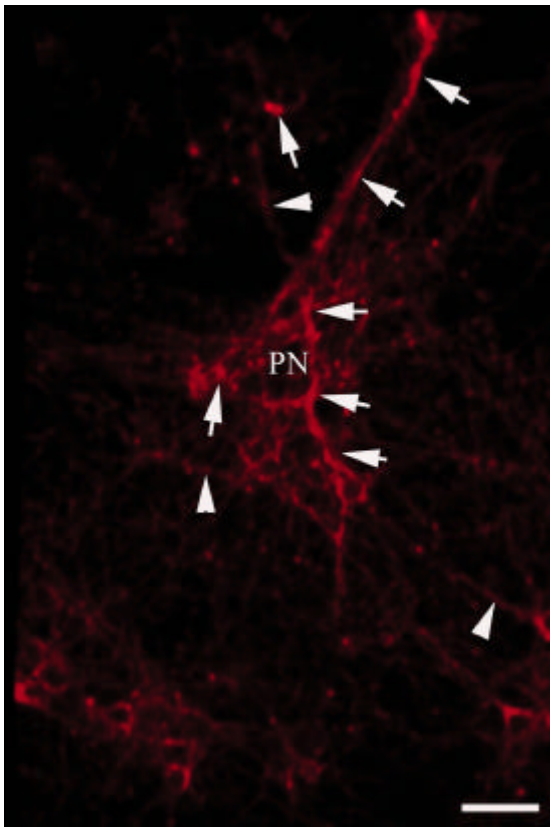


Abbildung 21: SNAP-25 nach 11 DIV

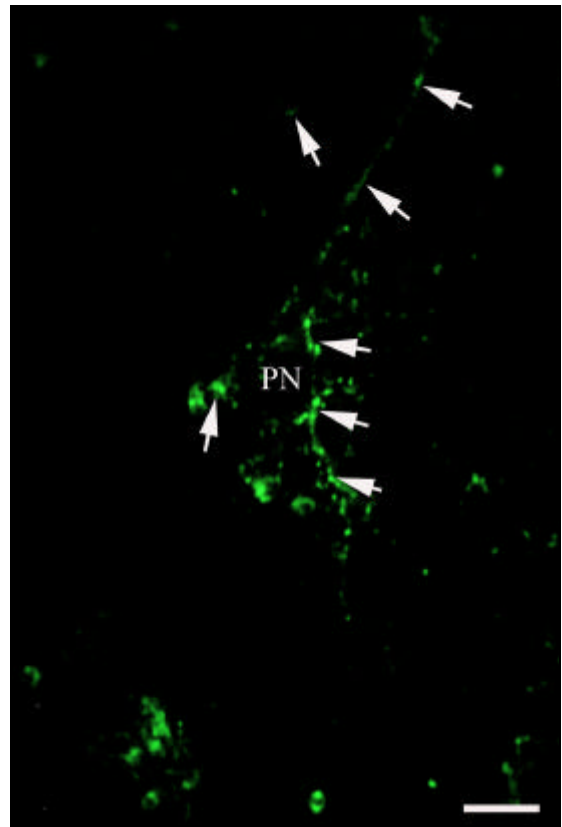


Abbildung 22: Synaptophysin nach 11 DIV

In diesem Stadium überwiegt die durch punktuelle Immunreaktionen gekennzeichnete Lokalisation des Proteins SNAP-25 an Synapsen entlang der Fortsätze und Somaoberfläche (Pfeile). Synaptophysin markiert als synaptisches Vesikelprotein Synapsen. Diese können dabei zu regelrechten Strängen konfluieren. SNAP-25 ist auch außerhalb von Synapsen in allen Fortsätzen detektiert (Pfeilspitzen). Die Perikarya sind kaum noch immunreaktiv. PN = Pyramidenneuron
Maßstab = 20 µm

Die Abbildung 23 wurde mit der CLSM-Technik erstellt. Punktueller Kolokalisation (gelb) mit dem synaptischen Vesikelprotein Synaptophysin entlang der Plasmamembran von Soma und Zellfortsätzen zeigen die Anreicherung von SNAP-25 in axo-somatischen und axo-dendritischen Synapsen. Daneben sind Markierungen nur für SNAP-25 (rot) an der gesamten Plasmamembran zu erkennen.

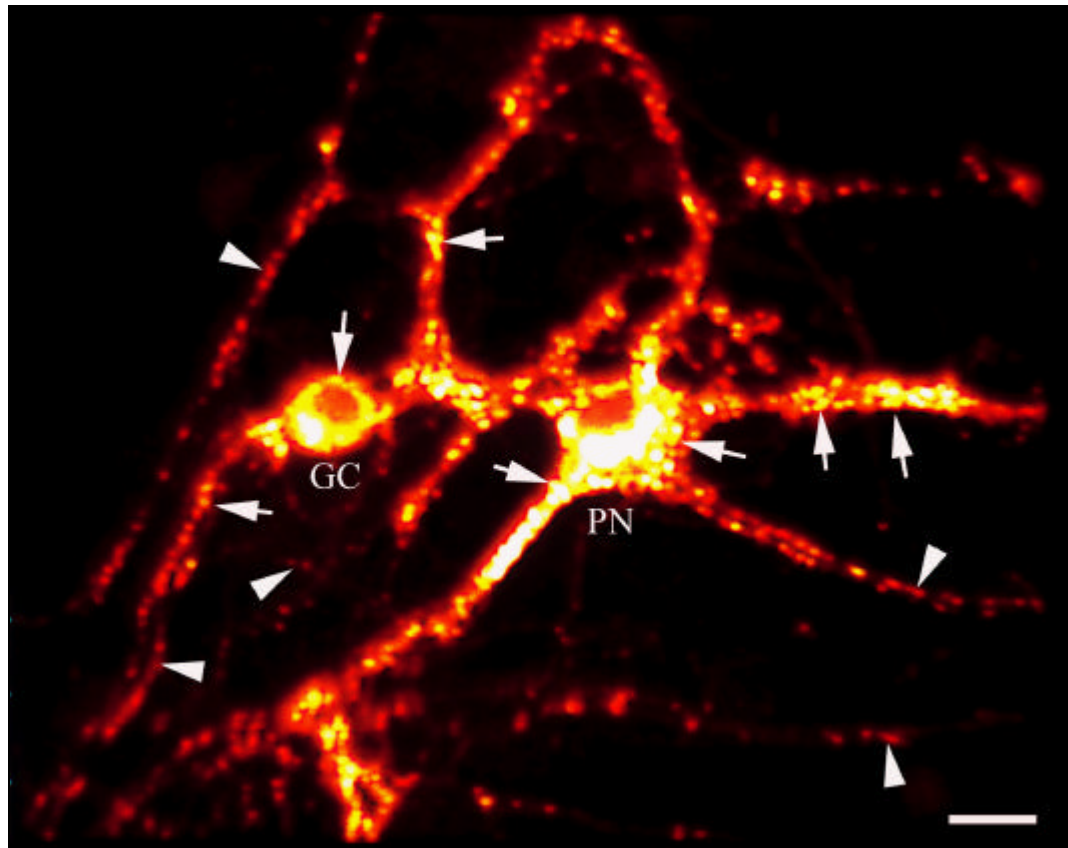


Abbildung 23: Kolokalisation von SNAP-25 und Synaptophysin nach 12 DIV

Gelbe punktförmige Immunreaktionen an der Oberfläche von Soma und Fortsätzen (Pfeile) zeigen die Kolokalisation von SNAP-25 und dem synaptischen Vesikelprotein Synaptophysin in synaptischen Strukturen. SNAP-25 ist außerdem an der gesamten Plasmamembran detektiert (rot, Pfeilspitzen). PN = Pyramidenneuron, GC = Körnerzelle, CLSM
Maßstab = 20 µm

In der Abbildung 24 und der Abbildung 25 ist die Doppelmarkierung eines Neurons mit SNAP-25 und Synaptophysin nach 23 DIV dargestellt. SNAP-25 und Synaptophysin sind entlang der Plasmamembran von Soma und Zellfortsätzen als punktuelle Immunreaktionen detektiert. Das perikarielle Zytoplasma ist nur schwach angefärbt, weil die Neusynthese von SNAP-25 und Synaptophysin im Vergleich zu den ersten Tagen *in vitro* stark reduziert ist.

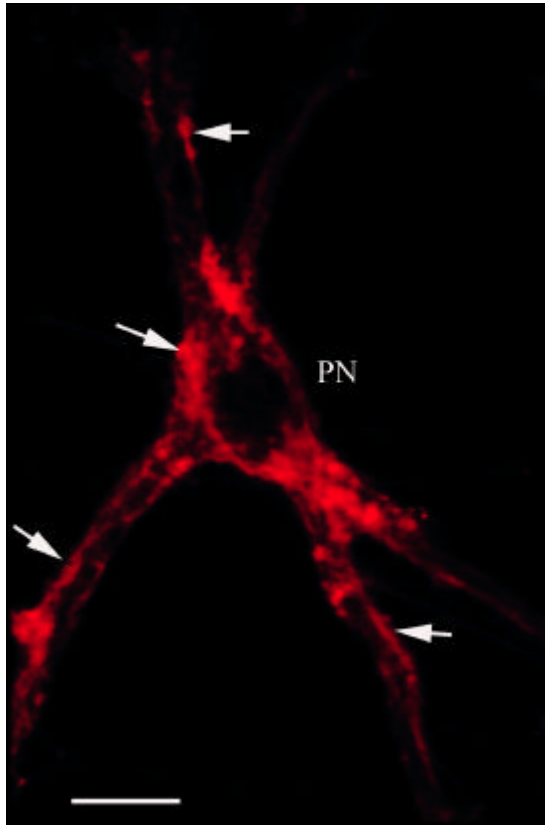


Abbildung 24: SNAP-25 nach 23 DIV

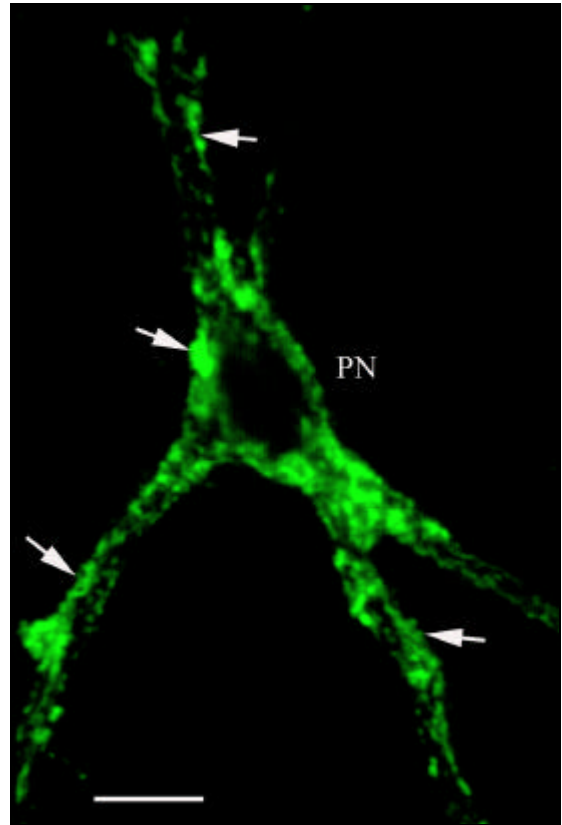


Abbildung 25: Synaptophysin nach 23 DIV

Die Doppelimmunfluoreszenzmarkierung zeigt eine Kolo-kalisation von SNAP-25 und Synaptophysin an Synapsen entlang der Zellmembranoberfläche. Konfluierende Synapsenstränge (Pfeile) entlang der perikariellen Zellmembran und der Fortsätze haben sich gebildet. Das Zellplasma zeigt nur geringe Immunreaktivität. PN = Pyramidenzelle Maßstab = 25 µm

Ultrastrukturelle Verteilung von SNAP-25

Die ultrastrukturelle Analyse ermöglicht die genaue Lokalisierung von SNAP-25 in spezifischen subzellulären Strukturen der hippocampalen Neurone. In Abbildung 26 ist ein axo-dendritischer Kontakt mit vier Aktivzonen dargestellt. SNAP-25 ist an synaptischen Vesikeln zu erkennen.

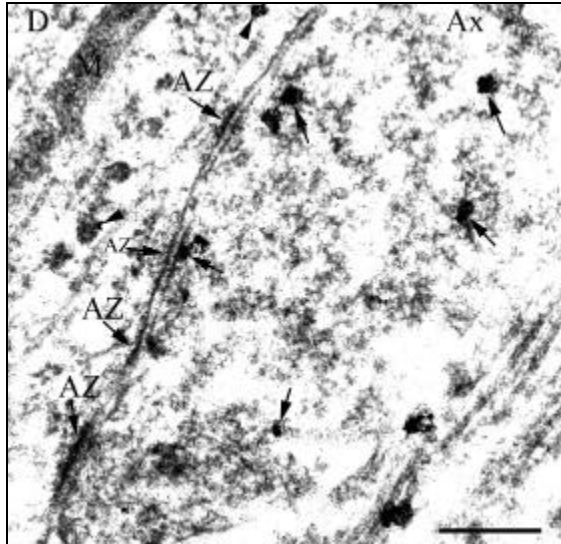


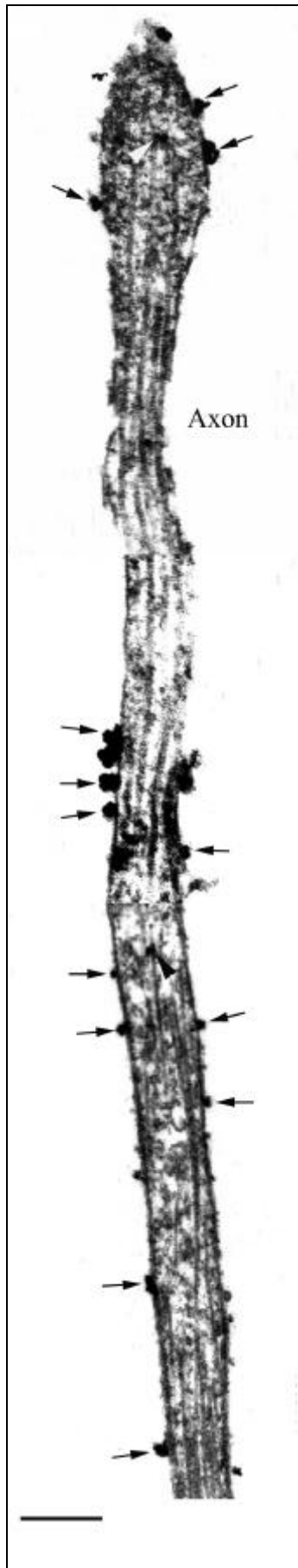
Abbildung 26: Ultrastruktur eines axo-dendritischen Kontaktes nach 13 DIV

Synapse mit 4 Aktivzonen (AZ). SNAP-25 ist in einigen synaptischen Vesikeln (Pfeile) immunodetektiert. Außerdem ist es in vesikulären Strukturen des postsynaptischen Dendriten zu erkennen (Pfeilspitze). Ax = Axon, D = Dendrit, Pre-embedding-Methode, Gold/Silber

Maßstab = 0,2 μ m

Die Abbildung 27 ist eine Photomontage mehrerer Axonabschnitte. Obwohl das gesamte SNAP-25 - Molekül an der Innenseite der Plasmamembran liegt, stellt sich der Antigen-Antikörper-Komplex nach Saponinbehandlung scheinbar an der äußeren Oberfläche dar. Dies erklärt sich aus der starken und nicht immer regelmäßig zirkulären Anheftung des Silbers an die 1 nm großen Goldpartikel des Sekundärantikörpers.

Abbildung 27: Photomontage eines Axons



Am distalen Ende des Axons ist der Wachstums-
kolben zu erkennen. SNAP-25 befindet sich in der
intakten Plasmamembran (Pfeile). Die Pfeilspitzen
zeigen es innerhalb des Axons als vesikuläre
Struktur. Pre-embedding-Methode nach 15 DIV,
Gold/Silber

Maßstab = 0,5 μm

Abbildung 28 zeigt den Ausschnitt eines Perikaryons. Nur intakte Zellmembranbestandteile sind mit SNAP-25 - Antikörpern detektiert. Dazwischen sind Perforationen der Plasmamembran zu erkennen, wie sie nach Permeabilisierung durch Saponin typisch sind. Sie ermöglichen den Antikörpern den Zugang zum Intrazellulärraum.

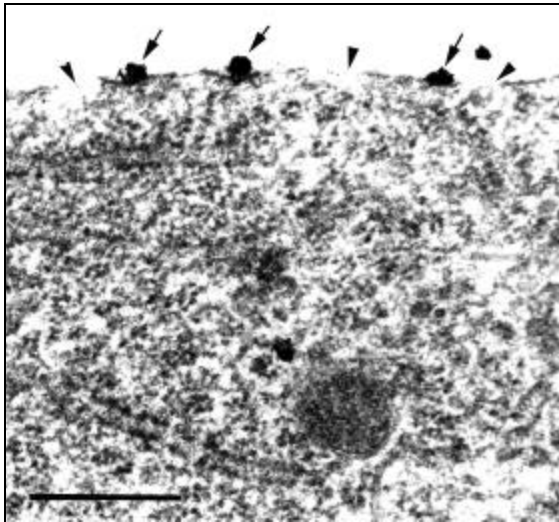


Abbildung 28: Ultrastruktur eines Perikaryonausschnittes

Nur am intakten Plasmamembranteil gelingt die Immundetektion von SNAP-25 (Pfeile). Dazwischen liegende Membrandefekte sind durch Saponinpermeabilisierung verursacht (Pfeilspitzen). Pre-embedding-Methode nach 15 DIV, Gold/Silber

Maßstab = 0,3 μ m

In Abbildung 29 ist ein axo-dendritischer Kontakt dargestellt. Immunmarkierungen für SNAP-25 sind an synaptischen Vesikeln, an der axonalen Plasmamembran und an vesikulären Strukturen in der Postsynapse zu erkennen.

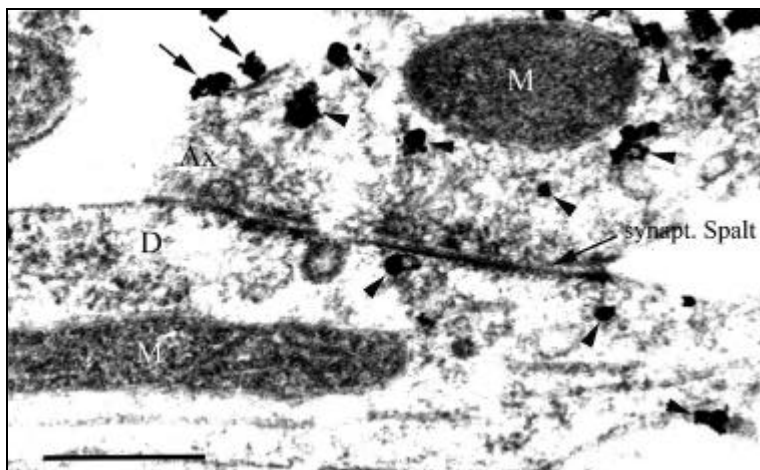


Abbildung 29: Ultrastruktur eines axo-dendritischen Kontaktes

Es sind neben drei synaptischen Aktivzonen SNAP-25-Immunmarkierungen an der intakten Zellmembran (Pfeil) und synaptischen Vesikeln (Pfeilspitzen) zu erkennen. In der Postsynapse ist es an vesikulären Strukturen zu finden. Ax = Axon, D = Dendrit, M = Mitochondrium, Pre-embedding - Methode nach 15 DIV,

Maßstab = 0,5 μ m

Abbildung 30 zeigt einen Dendritenausschnitt. Immunmarkierungen für SNAP-25 sind entlang der Plasmamembran und intrazellulär an vesikulären Strukturen zu erkennen.

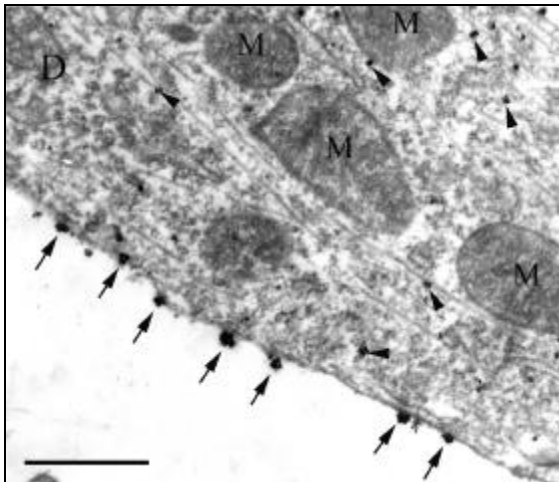


Abbildung 30: Ultrastruktur eines Dendriten

In dieser Abbildung (15 DIV) sind neben gut differenzierten Mitochondrien (M) SNAP-25-Immunmarkierungen an der Plasmamembran (Pfeile) und intrazellulär in Vesikeln (Pfeilspitzen) zu erkennen. D = Dendrit, Pre-embedding-Methode, Gold/Silber

Maßstab = 1µm

Auf den vorgestellten Abbildungen erkennt man, daß SNAP-25 nicht nur an synaptischen Vesikeln, sondern auch außerhalb synaptischer Kontakte an der Plasmamembran sowie an vesikulären Strukturen von Soma und Fortsätzen vorkommt. Aufgrund dieser Tatsache stellte sich uns die Frage, ob es an weiteren Prozessen außer der regulierten Exozytose in den Synapsen beteiligt ist. Dazu wurden Experimente mit Botulinumneurotoxin A durchgeführt, dessen proteolytisches Substrat SNAP-25 ist. Es wurde insbesondere der Frage nachgegangen, ob SNAP-25 auch bei der konstitutiven Exozytose, die für das Zellwachstum wesentlich ist, eine Rolle spielt.

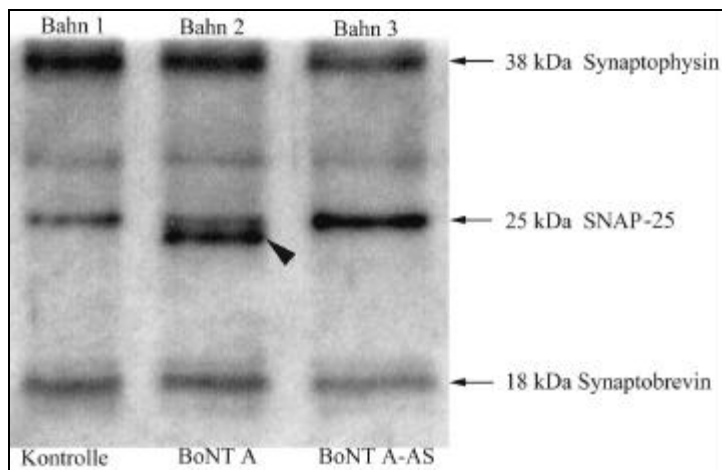
Der Einfluß von Botulinumneurotoxin A auf neuronale Zellkulturen

Nachweis von SNAP-25 in BoNT/A-behandelten neuronalen Zellkulturen

SNAP-25 ist das Proteolysesubstrat von Botulinumneurotoxin A. Als Teil des Fusionskomplexes, der aus Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin besteht, ist es essentiell für die synaptische Vesikel-exozytose. Die Spaltung aller SNAP-25-Moleküle durch BoNT/A kann die synaptische Transmission nicht vollständig ausschalten, sie wird aber um ein Vielfaches reduziert (Ahnert-Hilger1995; Stecher1989). Um eventuelle allgemeinzytotoxische Schädigungen durch BoNT/A zu verhindern, von denen die substratspezifischen Effekte des Toxins nicht abzugrenzen sind, wurde auf der Grundlage von Ergebnissen einer Vorversuchsreihe BoNT/A in einer Konzentration von 0,1 nM verwendet.

Die proteolytische Spaltung von SNAP-25 zeigt sich im Westernblot (Abbildung 31). In den drei gezeigten Bahnen wurden drei verschiedene Proteinproben sechs Tage alter hippocampaler Zellkulturen aufgetragen. Die erste stammt von einer unbehandelten Zellkultur. Die zweite Probe enthält die Zellen einer BoNT/A-vergifteten Zellkultur. In der dritten Bahn sind Proteine einer Zellkultur aufgetragen, die mit BoNT/A, das vor Gabe in die Zellkultur mit BoNT-Antiserum inkubiert wurde, behandelt ist. In der zweiten Bahn ist nicht gespaltenes SNAP-25 bei 25 kDa als schwache Bande zu sehen. Daneben zeigt sich in der zweiten Bahn eine starke Bande bei 24 kDa. Durch BoNT/A werden neun Aminosäuren vom COOH-Terminus des SNAP-25 abgespalten (Blasi1993a; Binz1994). Der gegen das N-terminale Ende gerichtete Antikörper erkennt auch das 24 kDa schwere Spaltprodukt. Weitere Proteine, Synaptophysin und Synaptobrevin, wurden als Kontrolle für die sonst unveränderte Zusammensetzung synaptischer Vesikelproteine in den Kulturen detektiert.

Abbildung 31: Der Einfluß von Bo/NT A auf sein Substrat SNAP-25



Sechs Tage alte Kulturen wurden für 24 h (5+1 DIV) mit BoNT/A (Bahn 2) oder BoNT/A+ Anti-serum (Bahn 3) behandelt. Die daraus gewonnenen Homogenate wurden ebenso wie die einer unbehandelte Kontrollkultur (Bahn1) mit Antikörpern gegen SNAP-25, Synaptobrevin und Synaptophysin detektiert. SNAP-25 ist als 25 kDa-, sein Spaltprodukt als 24 kDa-Bande zu erkennen (Pfeilspitze). Synaptophysin ist bei 38 kDa und Synaptobrevin bei 18 kDa markiert.

Qualitative Unterschiede zwischen BoNT/A-behandelten und Kontrollzellkulturen

Im phasenkontrastmikroskopischen Bild zwei Tage alter Kulturen, die zwei Stunden nach der Aussaat mit BoNT/A vergiftet worden sind (Abbildung 32), zeigen sich keine morphologischen Veränderungen an den Zellen gegenüber unbehandelten Kontrollkulturen (Abbildung 33). Der axonale Fortsatz ist in beiden Fällen deutlich schneller als die dendritischen Fortsätze gewachsen. Es ergaben sich nach 2 DIV und gleicher Behandlung mit BoNT/A bei Körnerzellen und Pyramidenneuronen keine Unterschiede.

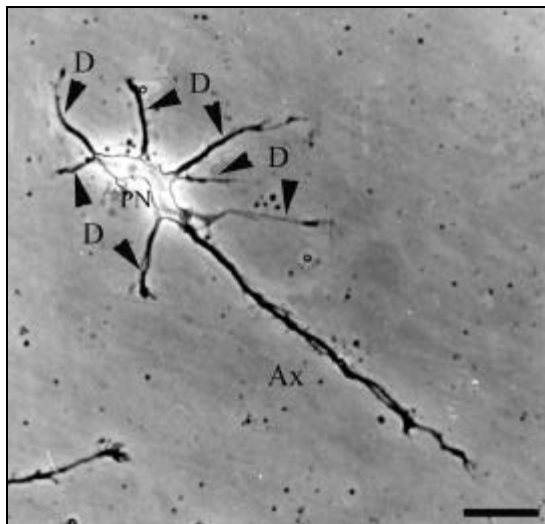


Abbildung 32: BoNT/A-vergiftetes Neuron nach 2 DIV

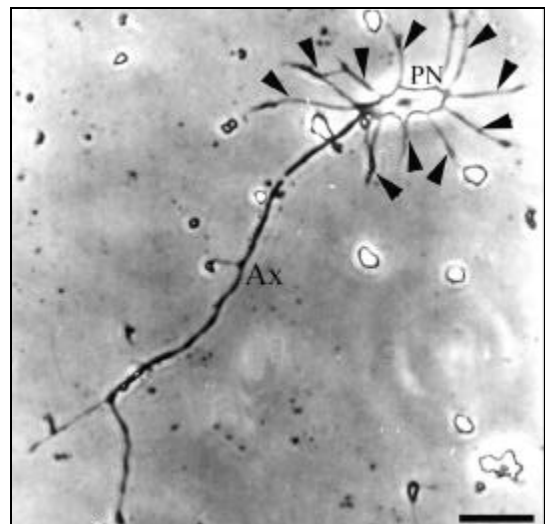


Abbildung 33: Unbehandeltes Neuron nach 2 DIV

Die Morphologie der mit 0,1nM BoNT/A behandelten Zelle zeigt keine Unterschiede gegenüber einer unbehandelten Nervenzelle. Bei beiden differenziert sich das Axon (Ax). Die Dendriten (D in Abb. 32 und Pfeilspitzen in Abb. 33) bleiben im Längenwachstum deutlich zurück. PN = Pyramidenzelle, MAP-2-Markierung, DAB-Färbung und Phasenkontrast

Maßstab = 10 µm

Bei 6 Tage alten Kulturen, die nach 1 DIV mit 0,1 nM BoNT/A behandelt wurden, ist wie bei gleichaltrigen, unbehandelten Kontrollkulturen zu erkennen, daß sich ein Fasernetzwerk mit Synapsen gebildet hat (Abbildung 34 und Abbildung 35). Die Morphologie der Fortsätze und Perikarya zeigt keine Unterschiede.

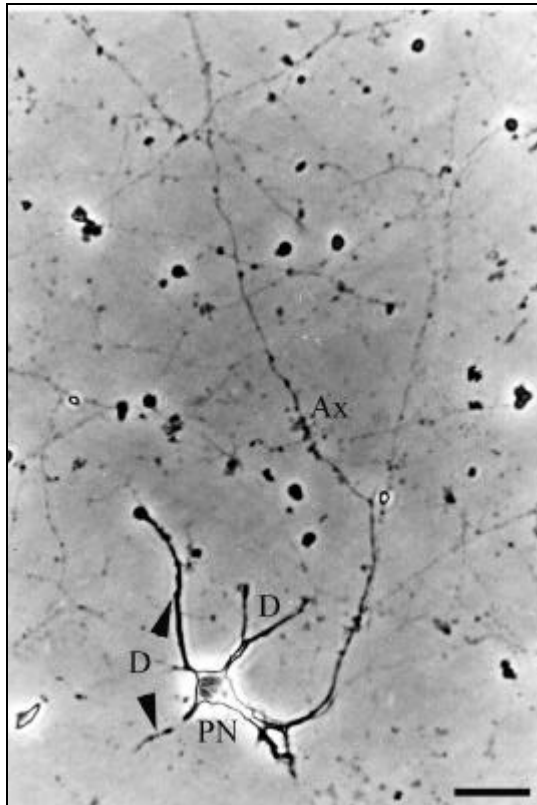


Abbildung 34

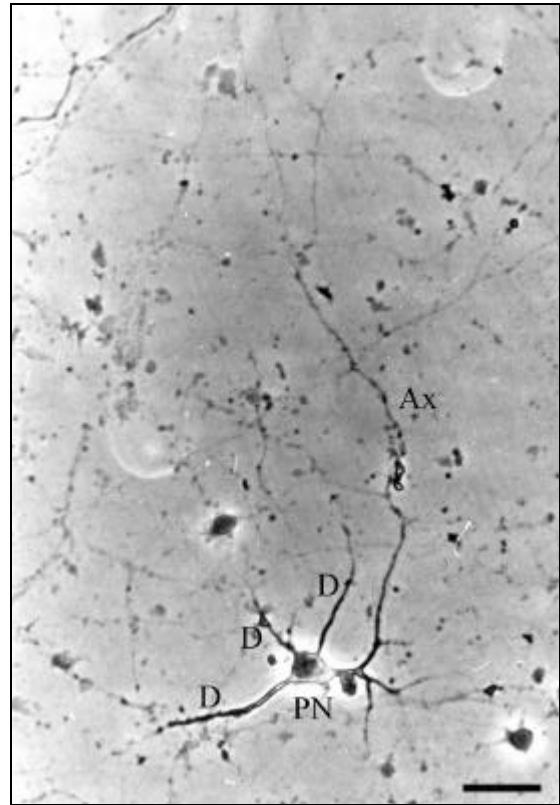


Abbildung 35

In diesen Abb. ist nach 6 DIV eine BoNT/A-vergiftete (Abbildung 34) einer unbehandelten Nervenzelle (Abbildung 35) gegenübergestellt. Es lassen sich zunächst keine morphologischen Unterschiede feststellen. Die Axone beider Zellen sind deutlich länger als die Dendriten und stark verzweigt. PN = Pyramidenzelle, Ax = Axon, D = Dendrit, MAP-2 - Markierung, DAB-Färbung und Phasenkontrast
Maßstab = 25 µm

Auch mit der Immunfluoreszenzmarkierung von SNAP-25 in sechs Tage alten Neuronen, die mit 0,1 nM BoNT/A behandelt wurden, lassen sich keine Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kultur erkennen. Die Neusynthese des Proteins in den Zellkörpern ist nicht unterbrochen. Doppelmarkierungen mit Synaptophysin zeigen die Anreicherung von SNAP-25 und Synaptophysin in Synapsen. Das ist nicht ganz unerwartet, da, wie bereits erwähnt, der größere Teil der SNAP-25 - Moleküle bei 0,1 nM BoNT/A gespalten wird, aber die am N-Terminal gelegenen Epitope für die Antikörper erhalten bleiben. Außerdem fallen linienförmige Immunmarkierungen von SNAP-25 entlang von Axonen und Dendriten auf (Abbildung 36), die sich nicht mit Synapsen bzw. der Synaptophysin-Markierung decken.

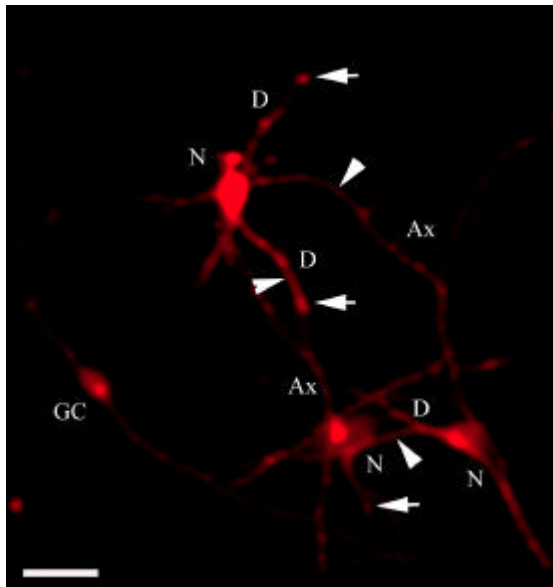


Abbildung 36: SNAP-25 in der BoNT/A-vergifteten Zellkultur

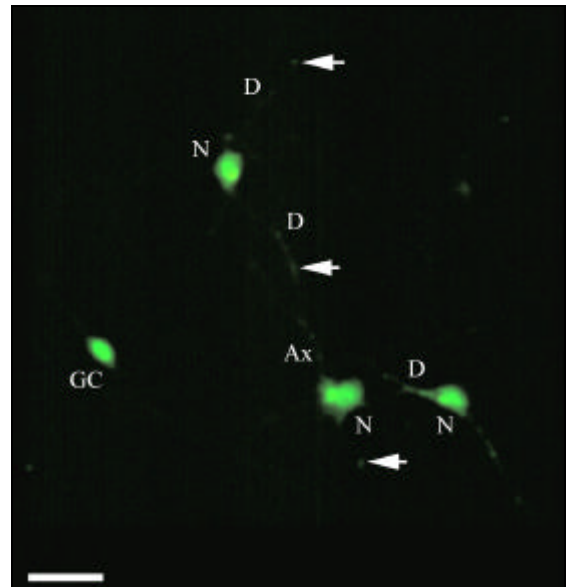


Abbildung 37: Synaptophysin in der BoNT/A-vergifteten Zellkultur

Das fluoreszenzmikroskopische Bild sechs Tage alter Hippocampuskulturen, die mit 0,1 nM BoNT/A behandelt wurden, zeigt keine Veränderungen in der SNAP-25-Verteilung in den Neuronen. Punktuelle Immunreaktionen (Pfeile) weisen auf synaptische Kontakte hin. Der Golgi-Apparat und das synthetisierende raue ER sind als perinukleäre Kappe zu erkennen. Eine eher linienförmige Markierung ist in dendritischen und axonalen Fortsätzen (Pfeilspitzen) zu sehen. Maßstab = 20 μm

Quantitative Unterschiede zwischen BoNT/A-behandelten und Kontrollkulturen

Um den Einfluß von BoNT/A auf die konstitutive Exozytose zu erfassen, ist das Wachstum von Dendriten und Axonen kultivierter Hippocampusneurone untersucht worden. Den Kulturen ist nach 1 DIV 0,1 nM BoNT/A zugesetzt worden. Die Dendriten der Körnerzellen und Pyramidenneurone wurden mit MAP-2 - Antikörpern immunmarkiert und die Axone durch Phasenkontrast dargestellt. Axone und Dendriten wurden an einem halbautomatischen Photomeßplatz vermessen. Die Meßdaten sind mit dem U-Test nach Mann und Whitney, der für verteilungsunabhängige Parameter verwendet wird, statistisch verarbeitet worden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (mean) und Standardfehler des Mittelwertes (sem = standard error of the mean) in Tabelle 4 dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,01$ festgelegt. Zum Vergleich sind unbehandelte Kontrollkulturen und mit BoNT/A-Antiserum behandelte Kulturen vermessen worden. Signifikante Werte sind fettgedruckt.

Die Axonlänge ist bei den mit BoNT/A-behandelten Neuronen um etwa ein Drittel geringer. Die Axone vergifteter Zellen sind durchschnittlich 275 μm lang, die Axone von Kontrollkulturen 465 μm . Die Dendritenlänge ist unter BoNT/A-Einfluß um fast die Hälfte reduziert. Die Dendriten vergifteter Neurone sind durchschnittlich 44 μm und die Dendriten unbehandelter Kontrollkulturen 73 μm lang. Das Wachstum der Fortsätze der unbehandelten und der mit Antiserum gegen BoNT/A behandelten Zellen ist identisch zueinander gewesen und entspricht der normalen Wachstumsgeschwindigkeit in hippocampalen Zellkulturen (Dotti 1988). Da nur SNAP-25 gespalten wurde, und alle anderen Bedingungen konstant blieben, muß angenommen werden, daß SNAP-25 bei der konstitutiven Exozytose ebenso wie bei der regulierten Exozytose eine Rolle spielt.

Tabelle 4: Einfluß von Botulinumneurotoxin A auf das Wachstum von Axonen und Dendriten

	Axonlänge	Dendritenlänge	Dendriten/Neuron	Neurone
Kontrolle	465.5 +/- 50.1	73.2 +/-6.1	4.3 +/- 0.3	24
BoNT/A	275.2 +/- 34.3	44.6 +/- 3.1	4.0 +/- 0.3	18
BoNT/A+ Antiserum	465.7 +/- 42.6	80.7 +/- 5.5	3.9 +/- 0.2	35

Randomisiert ausgewählte Neurone aus sechs Tage alten BoNT/A-, BoNT/A-Antiserum- und nicht behandelten Zellkulturen wurden mittels VIDEOPLAN-Meßsystem vermessen und statistisch erfaßt. Bei BoNT/A-behandelten Zellen ist das Längenwachstum von Axonen und Dendriten hochsignifikant verringert. Die Ergebnisse der Fortsatzlängenmessung sind als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes in µm angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde der U-Test für verteilungsunabhängige Parameter nach Mann und Whitney verwandt. Hochsignifikanten Werten (fettgedruckt) wurde ein $p < 0,01$ zugrunde gelegt.

Der Einfluß von BoNT/A auf die regulierte Exozytose

Um den Einfluß von BoNT/A auf die Transmitterexozytose untersuchen zu können, wurde Meerrettichperoxidase (HRP) zu den Zellkulturen gegeben. Eine intakte synaptische Aktivität setzt die Rückführung und Neubeladung der synaptischen Vesikel-membranen nach der Transmitterexozytose voraus. Den Zellen zugesetzte exogene Marker, die vesikulär endozytiert werden können, aber nicht zellmembranpermeabel sind, müssen daher im Zellinneren nach der Exozytose auftauchen. Das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) ist ein endozytotisch aufgenommener Marker. Zu BoNT/A- vergifteten und unbehandelten Kontrollkulturen wurde 20 Minuten eine HRP-Lösung (5 mg HRP/ml, bei 37 °C oder 4°C) zugesetzt. Nach Fixierung und Entwicklung mit Diaminobenzidin (DAB) sind HRP-angereicherte Vesikel im Elektronenmikroskop geschwärzt zu erkennen. Unmarkierte Vesikel erscheinen optisch leer (Abbildung 38). Anhand der elektronenmikroskopischen Bilder sind die markierten und unmarkierten synaptischen Vesikel in den präsynaptischen Terminalen ausgezählt worden. Das errechnete Verhältnis gilt als indirektes Maß für die Vesikelexozytose. Mit HRP angereicherte endosomale Strukturen konnten aufgrund der charakteristischen Größenunterschiede (synaptische Vesikel ca. 50 nm im Durchmesser, bei Endosomen ca. 250 nm Durchmesser) ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt: Unter BoNT/A-Einfluß ist sowohl die absolute Anzahl HRP-enthaltender Vesikel als auch das Verhältnis von HRP-enthaltenden zu nicht HRP-enthaltenden Vesikeln als Maß exo-/endozytotischer Ereignisse gegenüber der Kontrolle signifikant verringert.

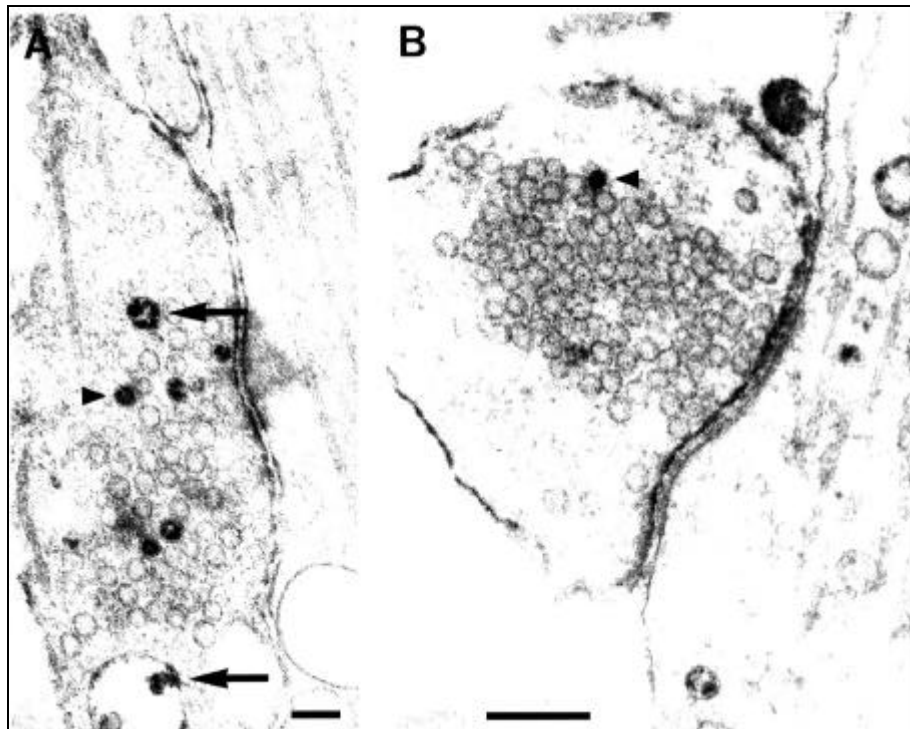


Abbildung 38: BoNT/A hemmt die synaptische Exozytose

Sechs Tage alte Zellkulturen wurden mit 0,1 nM BoNT/A vergiftet. Nach 8 DIV wurden die Kulturen 20 min mit einer HRP-Lösung (5 mg/ml bei 37°C) inkubiert. Die Anzahl HRP-angereicherter Vesikel (Pfeilspitzen) wurde durch das Toxin (B) gegenüber Kontrollen (A) deutlich verringert. Endosomale Strukturen (Pfeile in A) wurden nicht ausgezählt. DAB-Entwicklung

Maßstab = 0,5 μm

Tabelle 5: Blockierung der Transmitterexozytose durch Botulinumneurotoxin A

	ANZAHL DER SYNAPTISCHEN VESIKEL (μm^{-2})		RATIO	ANZAHL DER ANALYSIERTEN NERVENENDIGUNGEN
	markiert	nicht markiert	markiert/unmarkiert	N
Kontrolle	4.3 +/- 0.7	25.4 +/- 3.2	0.240 +/- 0.042	34
BoNT/A	1.3 +/- 0.3	28.4 +/- 3.2	0.059 +/- 0.015	44

Die hippocampalen Neurone sind mit und ohne BoNT/A-Behandlung nach 8 DIV für 20 min mit HRP (37°C) inkubiert worden. Nach DAB-Entwicklung konnten HRP-angereicherte Vesikel identifiziert werden. Anschließend sind markierte und nicht markierte Vesikel in einer BoNT/A-Gruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe ausgezählt worden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aufgeführt. Der Signifikanz ist ein $p < 0.01$ im U-Test nach Mann und Whitney zugrunde gelegt. Die Signifikanzen sind fettgedruckt.

Nach HRP-Inkubation bei 4°C wurden keine markierten Vesikel beobachtet.

Die Zelldichte unter BoNT/A-Einfluß

Die Zelldichtemessung hat zwischen unbehandelter und BoNT/A-vergifteter Zellkultur einen signifikanten Unterschied ergeben. Sowohl nach 2 DIV als auch nach 6 DIV hat sich bei den toxinbehandelten Kulturen die Zelldichte über das durch Apoptose (programmierter Zelltod) verursachte Maß hinaus verringert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die signifikanten Werte sind fettgedruckt.

Tabelle 6: Botulinumneurotoxin A beeinflusst die Zelldichte in hippocampalen Zellkulturen

	Zelldichte nach 2 DIV		Zelldichte nach 6 DIV	
	Kontrolle	BoNT/A	Kontrolle	BoNT/A
Anzahl der Zellen	213,5 +/-7,8	121+/-4,3	59,4 +/- 3,6	40,8 +/- 3,1

Die Wirkung von Botulinumneurotoxin C auf neuronale Zellkulturen

SNAP-25 ist neben Syntaxin auch Proteolysesubstrat von Botulinumneurotoxin C. Deshalb ist versucht worden, nach Zugabe dieses Toxins Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellkulturen zu erfassen.

Im Westernblot (Abbildung 39) ist die Spaltung von Syntaxin und SNAP-25 in hippocampalen Zellkulturen bei unterschiedlichen Konzentrationen von BoNT/C zu sehen. Auf die Bahn 1 ist Proteinmaterial einer unbehandelten Kontrollkultur aufgetragen worden. Auf den Bahnen 2-4 sind Homogenate unterschiedlicher Konzentrationen von BoNT/C-vergifteten Zellkulturen (24 h Einwirkzeit) aufgetragen worden. Die Immunmarkierungen für Syntaxin sind bei 35 kDa und für SNAP-25 bei 25 kDa zu erkennen. Bei 1 nM BoNT/C ist Syntaxin vollständig gespalten und bei einer Toxinkonzentration von 10 pM teilweise proteolysiert (Bahn 3). SNAP-25 ist bei 1 nM BoNT/C gespalten, es ist nur noch die 24 kDa-Bande zu sehen. Bei 10 pM Toxinkonzentration ist die 25 kDa-Bande deutlich schwächer als in der Kontrolle. Nach Einwirkung von 1 pM BoNT/C (Bahn 4) zeigt sich mit diesem Verfahren kein Unterschied zur Kontrollkultur. Außerdem sind Proteinkinase C α (PKC α) und Synaptobrevin als Kontrollproteine detektiert worden.

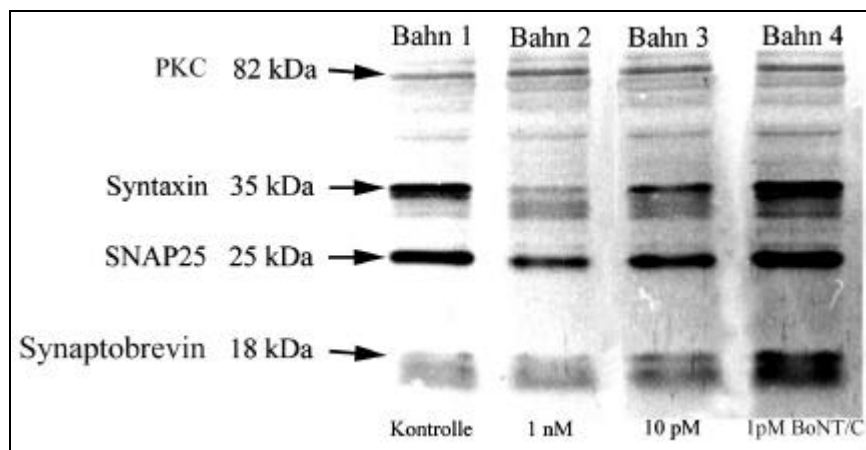


Abbildung 39: BoNT/C spaltet Syntaxin und SNAP-25

Auf Bahn1 sind Proteine einer unbehandelten Kontrollkultur und auf den Bahnen 2-4 Homogenate von BoNT/C-vergifteten Zellkulturen aufgetragen worden. Bei einer Konzentration von 1 nM BoNT/C (Bahn 2) sind Syntaxin und SNAP-25 gespalten. Proteinkinase C α und Synaptobrevin sind unverändert in Kontroll- und Versuchskulturen vorhanden.

Die mit BoNT/C vergifteten Zellen wiesen schon nach 1 DIV zytotoxische Schädigungen auf. Die Perikarya waren abgerundet und die Zellfortsätze aufgetrieben. Deshalb konnten keine Fortsatzlängenmessungen durchgeführt werden.

Diskussion

Die neuronale Entwicklung in der primär dissoziierten hippocampalen Zellkultur der embryonalen Maus

Nach der Zellaussaat haben sich die Neurone an den Poly-D-Lysin-beschichteten Gefäßboden angeheftet und begannen Fortsätze auszubilden. Nach 1 DIV war das Axon durch seine Morphologie von Dendriten zu unterscheiden (Banker1977; Dotti1988). Am distalen Ende zeigten alle Fortsätze eine Auftreibung, den Wachstumskolben. Das Axon wuchs schneller als die Dendriten, was Dotti und Mitarbeiter (Dotti1988) beschrieben. Sie beobachteten ein retardiertes Dendritenwachstum zwischen 1 DIV und 4 DIV. Das schnellere Auswachsen der Axone ist auch *in situ* an fetalen Hippocampi von Rhesusaffen beschrieben worden (Nowakowski1979). Die von uns durchgeführten morphometrischen Untersuchungen an kultivierten Neuronen zeigten eine durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit von ca. 70 $\mu\text{m}/\text{d}$ für Axone und von 12 $\mu\text{m}/\text{d}$ für Dendriten. Diese Wachstumsgeschwindigkeit war der von hippocampalen Neuronen der Ratte vergleichbar, die bei videomikroskopischen Untersuchungen gemessen wurde (Dotti1988). Neurone nach zwei und drei Wochen *in vitro* waren elektronenmikroskopisch durch helle Zellkerne, zahlreiche große Mitochondrien, bis in den proximalen Dendritenschaft ausgedehnte Golgifelder, Polyribosomen und dichtbesetztes ER gekennzeichnet. In Axonen fanden sich überwiegend Ribosomen und glattes ER. Sie besaßen viele, parallel gelagerte Mikrotubuli und zeichneten sich gegenüber den Dendriten durch ein gleichmäßiges Kaliber aus. Die Mikrotubuli in den Dendriten waren nicht so streng parallel angeordnet (Bartlett1984; Nowakowski1979).

Dotti und Mitarbeiter (Dotti1988) hatten innerhalb der ersten 24 h ein Aussprossen mehrerer uniformer Fortsätze beschrieben. Sie konnten nicht feststellen, warum einer dieser kurzen Fortsätze in das axontypische Wachstumsverhalten übergang. An einer Nervenzelle beobachteten sie, daß das vermeintliche Axon plötzlich im Wachstum stagnierte und ein anderer Fortsatz sich zum Axon differenzierte. Daraus schlußfolgerten sie, daß alle Fortsätze die Fähigkeit zur axonalen Differenzierung besaßen. Diese Annahme wurde dadurch unterstützt, daß nach Axotomie der verbliebene Stumpf sich zu einem Dendriten und ein anderer Fortsatz sich zum neuen Axon umwandelten (Dotti1987). Die Wahrscheinlichkeit der Regeneration des Axons nach Durchtrennung nahm mit der Entfernung der Axotomiestelle vom Perikaryon zu (Goslin1991). War der Axonstumpf kürzer als die Dendriten, so entwickelte sich ein ursprünglicher Dendrit zum neuen Axon.

1991 konnten Dotti und Banker (Dotti1991) aus strukturellen Veränderungen von Golgi-Apparat, Mikrotubuli oder Zentrosomen noch keine Vorhersage zum Abgang des Axons im Perikaryon machen. Neuere Untersuchungen (Bradke1997) ergaben, daß in hippocampalen Zellkulturen der sichtbaren Ausbildung des Axon eine Verschiebung von Membrankomponenten, Transportvesikeln, Mitochondrien, Peroxisomen und zytosolischen Proteinen in diesen Fortsatz vorausging.

Matus und Mitarbeiter (Matus1981) fanden in Axon und Dendriten unterschiedliche Zusammensetzungen mikrotubulärer Steuerproteine. Das anfänglich in der ganzen Nervenzelle vorkommende MAP-2 (*microtubule-associated protein 2*; Caceres1986) war ab 3-4 DIV nur noch im Zelleib und den Dendriten zu finden (DeCamilli1984; Caceres1984). Auch Glutamatrezeptoren zeigten anfänglich ein ubiquitäres und später ein somatodendritisches Verteilungsmuster (Craig1993). Die an Mikrotubuli gekoppelten Proteine tau und MAP-1 waren immer im Axon lokalisiert (Dotti1987; Goslin1991). Caceres und Kosik (Caceres1990) beobachteten bei cerebellären Zellkulturen, daß das Axonwachstum nach Blockierung der Synthese des Proteins tau durch antisense-Oligonukleotide gehemmt wird. Aus den Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen (Craig1994; Tanaka1995 ; Diaz1996) ging hervor, daß ein Zusammenspiel von Aktinfilamenten, Mikrotubuli, Steuerproteinen und extrazellulären Botenstoffen während des Zellwachstums notwendig ist, viele Einzelheiten aber noch nicht geklärt sind. Danach steuern Wachstumsfaktoren über plasmalemmale Rezeptoren verschiedene zytosolische GTPasen, die ihrerseits über Kinasen die Zusammenstellung von Aktinfilamenten beeinflussen. Die Aktivität der fortsatzspezifischen, mikrotubulären Steuerproteine (MAPs) unterliegt ebenfalls dem Einfluß extrazellulärer Wachstumsfaktoren.

Synaptogenese in der dissoziierten hippocampalen Zellkultur war schon nach 3 DIV durch immunzytochemische Markierung synaptischer Vesikelpoteine zu sehen (Fletcher1991; Matteoli1992). In den ersten Tagen *in vitro* waren synaptische Vesikelpoteine, wie Synaptophysin, SNAP-25 und Synaptobrevin nur im Perikaryon als Syntheseort zu beobachten. Die Anreicherung der synaptischen Vesikelpoteine Synaptophysin, Synapsin, Synaptotagmin und rab3A in der Präsynapse neuronaler Zellen wurde *in situ* (Bergmann1991; Bergmann1993; Ovtcharoff1993; Grabs1994) und *in vitro* (Fletcher1991; Fletcher1994; TixierVidal1992; Mundigl1993; Basarsky1994; Kraszewski1995; Grosse1998) beschrieben. Die detaillierte Übereinstimmung in Proteinausstattung und Struktur *in vitro* mit der *in situ* erlaubt es, aus Experimenten an Einzelzellen in der Zellkultur Rückschlüsse auf die *in situ*-Verhältnisse zu ziehen.

In hippocampalen Kokulturen unterschiedlich alter Nervenzellen wurde beobachtet, daß die funktionelle Reife der Postsynapse entscheidend für die Entwicklung synaptischer Strukturen war (Fletcher1994). Frisch dissoziierte Neurone wurden zwei Tage alten neuronalen Kulturen zugesetzt. Nach einem Tag traten in den Axonen der jüngeren Zellen (1DIV) präsynaptische Strukturen auf, die Synapsen mit den Dendriten der älteren Neurone (3-4 DIV) bildeten. Die Axone der älteren Neurone entwickelten bei Kontakt mit den jüngeren Nervenzellen erst dann präsynaptische Strukturen, wenn sie mindestens drei Tage kultiviert worden waren. Glutamatrezeptoren wurden in der postsynaptischen Dendritenmembran schon nach 2 DIV vor der Etablierung reifer Synapsen exprimiert (Verderio1994). Gleichzeitig fand eine kalziumabhängige Glutamatfreisetzung aus präsynaptischen Strukturen statt (Verderio1995). An der neuromuskulären Endplatte bewirkte die Postsynapse die Reifung präsynaptischer Strukturen (Wallace1996). Die gegenseitige Beeinflussung scheint für den synaptischen Reifungsprozeß notwendig zu sein. Ausschlaggebend für die Bildung synaptischer Strukturen ist die Entwicklung der Postsynapse.

Hippocampuspezifische synaptische Differenzierungen, wie Moosfaserboutons, bildeten sich regelmäßig nach drei Wochen *in vitro*. Sie sind die Endigungen unmyelinisierter Körnerzellaxone an proximalen CA3-Pyramidenzeldendriten (Tömböl1978 ; Gaarskjaer1986; Chicurel1992). Elektronenmikroskopisch erkannte man in den Boutons, die einen Durchmesser von bis zu 5 µm haben, zahlreiche synaptische Vesikel, LDCV und große Mitochondrien, die mit verzweigten dendritischen Spines (Exreszenzen) synaptische Kontakte bildeten. Puncta adhaerentia zeichnen die Verbindungen der Moosfasern und Dendritenschäfte aus (Peters1976). Da sich Moosfasern auch in dissoziierten Zellkulturen entwickelten (Grosse1998), sind diese Zellkulturen den Verhältnissen in organotypischen Slicekulturen (Zimmer1987; Dailey1994) und den *in situ*-Verhältnissen (Blackstad1961; Grabs1994) sehr ähnlich. Die vergleichbare Zellmorphologie und Synapsenreifung *in vitro* und *in situ* war Grundlage für Experimente an diesen Zellkulturen.

Die entwicklungsabhängige Proteinsynthese und Lokalisation von SNAP-25 in der primär dissoziierten hippocampalen Zellkultur

Das synaptische Vesikelpotein SNAP-25 wurde schon nach 2 DIV im Perikaryon exprimiert. Die Zelleiber waren immundetektiert, da eine intensive Proteinsynthese stattfand. Nach 3 DIV zeigten sich Immunmarkierungen in den Zellfortsätzen. Nach 6 DIV erkannte man punktuelle Immunreaktionen in präsynaptischen Strukturen (Fletcher1991; Matteoli1992). Außerdem kam SNAP-25 in der Plasmamembran aller neuronalen Fortsätze vor. Die dendritische Lokalisation wurde durch Koloalisation mit den dendritischen Markern Transferrin-Rezeptor und MAP-2 nachgewiesen. Elektronenmikroskopisch wurde SNAP-25 in der intakten axonalen und somatodendritischen Plasmamembran sowie in synaptischen Vesikeln beobachtet.

Die Immundetektion von SNAP-25 in der Plasmamembran des Axons und an synaptischen Vesikeln ist beschrieben worden (Oyler1991; Duc1995; Garcia1995). Eine SNAP-25-Lokalisation in der Plasmamembran von Perikaryon und Dendriten war bisher nicht bekannt.

Da SNAP-25, wie wir feststellten, ubiquitär in der neuronalen Plasmamembran vorkam, waren nach BoNT/A-Gabe Auswirkungen auf die zelluläre Verteilung von SNAP-25 zu erwarten. Die Hemmung der Exozytose durch proteolytische Inaktivierung von SNAP-25 wurde in unseren Kulturen nachgewiesen und war vergleichbar mit vorangegangenen Studien an endokrinen Zellen (Stecher1989; Dayanithi1990; Sadoul1995 ; HöhneZell1996) und Neuronen (Blasi1993a; Williamson1996). Die SNARE-Hypothese (Söllner1993a; Söllner1993b) erklärt, daß mit dem durch

BoNT/A gespaltenen SNAP-25 noch Fusionskomplexe gebildet werden können (Hayashi1994), aber die kalziumabhängige Transmitterexozytose blockiert ist (Xu1998).

Der Einfluß von BoNT/A auf das Fortsatzwachstum kultivierter hippocampaler Neurone

Die Inaktivierung von SNAP-25 durch antisense-Oligonukleotide oder BoNT/A hemmt das Axonwachstum von PC-12 - Zellen und postnatalen Cortexneuronen (OsenSand1993; OsenSand1996).

Wir konnten zeigen, daß in fetalen Hippocampusneuronen bei BoNT/A-Vergiftung nicht nur das Wachstum der Axone deutlich retardiert, sondern auch das Dendritenwachstum signifikant verringert war. Das ist auf eine Reduzierung konstitutiver Exozytoseprozesse in Dendriten zurückzuführen.

Über dendritisches Wachstum ist wenig bekannt. In frisch ausgesäten hippocampalen Neuronen sprießen zunächst Lamellipodien aus (Dotti1988). Diese Scheinfüßchen sind *in situ* nicht zu beobachten. Innerhalb der ersten 24 Stunden bilden sich mehrere kleine Fortsätze aus (Deitch1993), die sich während der darauffolgenden Tage in Axon und Dendriten differenzieren. Alle Fortsätze haben an ihrem distalen Ende einen Wachstumskolben. Zwischen 2 DIV und 4 DIV stagniert das Dendritenwachstum, während das Axon mit hoher Geschwindigkeit auswächst und sich verzweigt (Dotti1988). Von der Calcium-Calmodulin-Kinase II (CaMK II) ist bekannt, daß sie an der Hemmung des Dendritenwachstums unreifer Neurone retinotectaler Bahnen beteiligt ist (Wu1998). Ein Substrat dieser Kinase ist SNAP-25 (Hirling1996).

Im Gegensatz zu den wenigen Beobachtungen über Dendritenwachstum ist über axonales Wachstum mehr bekannt.

Axonwachstum findet am Wachstumskolben statt. Dieser besteht aus einer vesikelreichen zentralen Domäne. Eine weitere, mikrofilamentreiche periphere Domäne, enthält Filopodien und Lamellipodien, die für die Motilität des Axons verantwortlich sind (Dailey1993). Die exozytotische Anlagerung von Vesikelmembranen in der zentralen Region des Wachstumskolbens führt zum Wachstum (Lockerbie1991; Pfenninger1993; DeCamilli1993). Andocken und Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran ist mit dem Modell der SNARE-Hypothese (Söllner1993a; Söllner1993b; Rothman1994) zu erklären. Für die darin postulierte Beteiligung der SNARE-Proteine bei konstitutiven Fusionsprozessen spricht, daß die proteolytische Spaltung von Syntaxin durch BoNT/C1 (Blasi1993b) zu einem Kollaps des Wachstumskolbens führt (Igarashi1996). In Hefen können mit rekombinantem SNAP-25, Syntaxin und Synaptobrevin bestückte Vakuolen fusionieren (Weber1998). Die Gen-Deletion des synaptischen Vesikelproteins Synapsin-1 (Greengard1993) hemmt bei Mäusen ebenfalls das Axonwachstum (Chin1995).

Das frühe Wachstum geht mit Exo-/Endozytosezyklen von Vesikeln einher (Matteoli1992). SNAP-25, Syntaxin und Synaptobrevin werden axonal als Komplex transportiert (Shiff1997; Morel1998), und in isolierten Wachstumskolben als SNARE-Komplex nachgewiesen (Igarashi1997). Wachstumsvesikel scheinen in ihrer Membranzusammensetzung den synaptischen und sekretorischen Vesikeln (HöhneZell1996; Otto1997) vergleichbar zu sein.

Dem steht entgegen, daß die proteolytische Spaltung von Synaptobrevin durch Tetanustoxin die regulierte Transmitterexozytose hemmt, nicht aber das Axonwachstum beeinflusst (Ahnert-Hilger1995; OsenSand1996; Grosse1998). Dies läßt die Frage zu, ob an der konstitutiven Exozytose der gesamte SNARE-Komplex beteiligt sein muß, oder SNAP-25 und Syntaxin als t-t-SNARE-Verbindung bei der konstitutiven Exozytose wirksam werden können, wie an ER-Membranen von Hefen gezeigt wurde (Patel1998). An Epithelzellen wurden tetanustoxinresistente Isoformen von Synaptobrevin beschrieben (Galli1998).

Vesikuläres Synaptotagmin, ein Kalziumsensor der Transmitterfreisetzung, hat keinen Einfluß auf das Axonwachstum. Das haben Deletionsversuche an Drosophila-Fliegen ergeben (Littleton1995). In einer frühen Wachstumsphase sind in den Wachstumskolben weder synaptische Vesikel noch Synaptotagmin I zu finden (Igarashi1997). In dieser Wachstumsphase kann die Bildung von SNARE-Komplexen beobachtet, aber keine Fusionskomplex-Bildung (Söllner1993a; Söllner1993b;

Rothman1994) durch Zugabe von NSF und α -SNAP forciert werden (Igarashi1997). Der Synaptophysin/Synaptobrevin-Komplex, der die Verfügbarkeit von vesikulärem Synaptobrevin für den Fusionskomplex reguliert (Calakos1994b; Edelman1995; Washbourne1995; Becher1998) kommt zu diesem Zeitpunkt nicht im Wachstumskolben vor (Igarashi1997). Das Vorkommen von Synaptophysin in axonalen und dendritischen Vesikeln zu späteren Zeitpunkten in der Entwicklung ist auf eine regulierende Funktion Synaptophysins bei der Verfügbarkeit des Synaptobrevins für konstitutive Exozytoseprozesse zurückzuführen.

Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, ob der Zellmembraneinbau nur an den Wachstumskolben erfolgt. Weitere Möglichkeiten sind Wachstum am Zelleib oder an der gesamten Plasmamembran (Bray1970).

Daß Membranwachstum überall an der Zelle stattfindet, leiteten Popov und Mitarbeiter (Popov1993) aus ihren Experimenten an *Xenopus*-Neuronen ab. Dabei zeigte sich in Wachstumsphasen ein ausschließlich anterograde Fluß farbstoffmarkierter Lipide, dessen Tempo genau dem zum Wachstum benötigten entsprach. Die Lipide wurden überall in die Zellmembran eingebaut.

Wenn Membraneinbau ausschließlich an den Fortsatzenden stattfände (Lockerbie1991; Pfenninger1993; DeCamilli1993), bedeutete das eine Plasmamembranbewegung in Richtung Zelleib. Dai und Sheetz (Dai1995) bestätigten diese Annahme, indem sie Axone mit kleinen Partikeln versetzten, die gegen Glykoproteine und Lipide gerichtete Antikörper enthielten. Diese Partikel bewegten sich auf das Perikaryon zu. Treibende Kraft sollte ein zwischen Perikaryon und distalem Fortsatzende gemessener Membranspannungsgradient sein.

Experimente, in denen verschiedene Membranbausteine herausgelöst wurden, erbrachten für den nachfolgenden Neueinbau unterschiedliche Ergebnisse. Glykoproteine, Glykolipide und ein transmembranöses Protein wurden in den Wachstumskolben (Pfenninger1981; Craig1995), Natriumkanäle am Perikaryon (Strichartz1984) und ein glykorylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Protein entlang der gesamten Axonoberfläche (Harel1996) eingebaut. Proteineinbau an Axonen auch außerhalb des Wachstumskolbens könnte sehr einfach die überwiegende Lokalisation von Natriumkanälen an den Ranvier'schen Schnürringen erklären. Die plasmalemale Lokalisation von Syntaxin (Bennett1993a) und SNAP-25 würde die Voraussetzung für den Einbau bieten.

Zur Klärung des Phänomens Zellwachstums tragen Erkenntnisse über Synthese und Transport von Membrankomponenten bei. So werden synaptische Vesikelproteine im Perikaryon synthetisiert. Proteinsynthetisierende Polyribosomen und rER kommen auch in den proximalen Dendriten kultivierter Neurone vor (Bartlett1984; Deitch1993). Der Transport zum Zielort erfolgt vesikulär entlang tubulärer Strukturen. Lipidsynthetisierendes glattes ER ist im Perikaryon, in Dendriten und Axonen zu finden (Bartlett1984; Deitch1993). Im distalen Axon lokalisierte Enzyme der Lipidsynthese sind beschrieben worden (Vance1994). Aus Experimenten mit isotope markiertem Phosphatidylcholin ergab sich, daß ein Teil des Phosphatidylcholins im distalen Axon synthetisiert wird, während der andere Teil aus dem Perikaryon stammt (DeChaves1995).

Membranlipide und -proteine beanspruchen unterschiedliche Transportmechanismen, denn trotz Blockierung des vesikulären Transports zwischen Golgi-Apparat und Zelloberfläche, erreichen neu synthetisierte Lipide die Zellmembran (Shiao1993).

Da BoNT/C ebenso wie BoNT/A SNAP-25 proteolytisch spaltet (Williamson1996; OsenSand1996; Foran1996), lag es nahe, gleiche Experimente mit BoNT/C-vergifteten Neuronen durchzuführen. Weil schon nach 1 DIV bei einer Konzentration von 1nM BoNT/C zytotoxische Schädigungen zu erkennen waren, konnten Fortsatzlängenmessungen nicht durchgeführt werden. Die Ursachen dafür können unterschiedlicher Natur sein. Das uns zur Verfügung stehende BoNT/C ist mit Hämagglutininen (Ahnert-Hilger1995) und Proteasen (Ahnert-Hilger, unveröffentl. Beobachtungen) kontaminiert. Es ist außerdem ein Gemisch aus BoNT/C1 und den Exoenzymen C2 und C3. Neben SNAP-25 ist Syntaxin proteolytisches Substrat von BoNT/C1 (Blasi1993b), so daß die zytotoxische Schädigung auch durch die Spaltung von zwei Proteinen des Fusionskomplexes hervorgerufen sein könnte. In *Drosophila*-fliegen hatte die Deletion des Syntaxin-Gens eine hohe Letalität zur Folge (Schulze1995). Williamson und Neale (Williamson1998) konnten den bereits beschriebenen Einfluß (OsenSand1996) der zytotoxischen Schädigung von BoNT/C auf die Zellentwicklung

bestätigen. Sie hatten dabei die Wirkung des Exoenzym C3 mittels spezifischer Antikörper ausgeschlossen. Ihre Beobachtungen zum Fortsatzwachstum konnten sie nicht quantifizieren.

Bei verschiedenartigen Schädigungen der Wachstumsprozesse kommt es zu unterschiedlichen Zeitintervallen zwischen Schädigung und Effekt. Die Blockierung von SNAP-25 durch antisense-Oligonukleotide oder BoNT/A hemmt das Axonwachstum nach Tagen (OsenSand1993). Die Blockierung der Lipidsynthese durch Fumo-nisin B₁ hemmt die Axonelongation nach mehreren Stunden (Harel1993). Die Zerstörung des Golgi-Apparates durch Brefeldin-A zeigt innerhalb einer Stunde (Jareb1991) und die Zerstörung des axonalen Transportes durch Laserstrahlen innerhalb weniger Minuten Wirkung (Martenson1993).

Da BoNT/A und andere BoNT in der Medizin therapeutisch genutzt werden, ist es wichtig, alle direkten und indirekten Wirkungen dieser Toxine zu klären.

BoNT/A wurde erstmalig einem Patienten mit Strabismus lokal injiziert (Scott1980). Seither breitete sich das Anwendungsspektrum auf Blepharospasmus, Spasmen der mimischen Muskulatur, Torticollis oder Sphinkterspasmen des Gastro-Intestinal-Traktes aus. Die Wirkung auf das vegetative Nervensystem wird zum Beispiel bei der Therapie der Hyperhidrosis genutzt. Bislang gibt es kein standardisiertes Behandlungskonzept (Montecucco1996). Hauptsächlich wird BoNT/A verwandt. Das für therapeutische Zwecke verfügbare Toxin ist an Hämagglutinine und andere Proteine gebunden. Daraus erwächst das Problem der Therapieresistenz durch Antikörper gegen diese Antigene. In diesem Fall ist die Weiterbehandlung mit BoNT/B und BoNT/F möglich. Dabei ist eine kürzere Wirkdauer zu beobachten, die auch der schnelleren Genesung nach BoNT/B- oder BoNT/F-Intoxikation gegenüber der BoNT/A-Vergiftung entspricht. BoNT/C ist noch in der klinischen Erprobung (Montecucco1996). BoNT/E spaltet vom C-terminalen Ende des SNAP-25 ein 26 Aminosäuren langes Peptid ab. In neuroendokrinen Zellen wurde nach Injektion solcher synthetisch hergestellten Peptide die Fusionkomplexbildung und dadurch die Sekretion gehemmt (Ferrer1998). Theoretisch ergibt sich daraus die Möglichkeit, anstelle von BoNT diese synthetisierten Stumpfpeptide für Behandlungszwecke zu verwenden.

Für die Weiterentwicklung der therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten mit BoNT/A stellen unsere Erkenntnisse wesentliche Grundlagen dar, denn die Beteiligung von SNAP-25 am Wachstum mittels konstitutiver Exozytose muß bei der Erweiterung der Behandlungsmöglichkeiten mit BoNT/A berücksichtigt werden.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluß des Botulinumneurotoxins A auf die Entwicklung und Synaptogenese hippocampaler Nervenzellen untersucht. Dazu wurde das *in vitro*-Modell der primär dissoziierten hippocampalen Zellkultur der embryonalen Maus verwandt.

Durch immunzytochemische Detektion synaptischer Vesikelproteine und anderer neuronaler Marker, wie MAP-2 und Transferrin-Rezeptor, konnte auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene die Entwicklung der Neurone verfolgt werden. Die Charakterisierung der Zellmorphologie und Reifung synaptischer Strukturen ergab ein der *in situ*-Entwicklung vergleichbares Bild. Innerhalb von 24 h nach der Aussaat der Neurone wuchsen neue Zellfortsätze aus. Nach 2 DIV konnten Axone und Dendriten voneinander unterschieden werden. Die Axone reifer hippocampaler Körnerzellen bildeten wie *in vivo* Moosfaserboutons an den proximalen Dendriten von Pyramidenneuronen. Synaptische Vesikelproteine zeigten eine entwicklungsabhängige Umverteilung vom Perikaryon in die Fortsätze und präsynaptischen Strukturen.

Synaptosomal-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) kam außer in präsynaptischen Strukturen auch in der axonalen und somatodendritischen Plasmamembran vor, was auf lichtmikroskopischer Ebene durch Kolo-kalisation mit dendritischen Markern wie Transferrin-Rezeptor und MAP-2, sowie ultrastrukturell nachgewiesen wurde. BoNT/A inaktiviert SNAP-25 durch proteolytische Spaltung. Bei Gabe von BoNT/A zu hippocampalen Zellkulturen wurde die Transmitterexozytose an den Synapsen blockiert. Außerdem waren Axone und Dendriten signifikant verkürzt. Das deutet auf die Beteiligung von SNAP-25 nicht nur bei axonalem, sondern auch bei dendritischem Wachstum durch Blockierung der konstitutiven Exozytose durch BoNT/A hin.

Schlußfolgerungen

1. **Das angewandte *in vitro*-Modell erlaubt es, Rückschlüsse auf die neuronale Entwicklung *in situ* zu ziehen.** In den Zellkulturen der Hippocampi embryonaler Mäuse zeigten Zellmorphologie, Synaptogenese und die Ausstattung der Synapsen mit synaptischen Vesikelproteinen wesentliche Übereinstimmungen mit der neuronalen Entwicklung *in situ*. Die spezifischen Strukturen der Moosfaserboutons, die *in vivo* terminalen Axonendigungen hippocampaler Körnerzellen an den proximalen Dendriten von Pyramidenneuronen entsprechen, lassen sich ebenfalls in der Zellkultur wiederfinden.
2. **Das synaptische Vesikelprotein SNAP-25 unterliegt einer entwicklungsabhängigen Umverteilung in einer Nervenzelle.** SNAP-25 wurde schon nach 1 DIV im Perikaryon synthetisiert. Während der Reifung synaptischer Strukturen akkumulierte es in der Präsynapse, war aber außerdem in der Plasmamembran von Soma, Axon und Dendriten zu finden.
3. **Botulinumneurotoxin A blockiert die regulierte Exozytose.** Die proteolytische Inaktivierung von SNAP-25 durch BoNT/A hemmte die Transmitterausschüttung aus synaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt.
4. **Botulinumneurotoxin A hemmt *in vitro* das Wachstums hippocampaler Neurone.** Mit BoNT/A behandelte Nervenzellen zeigten signifikant kürzere Axone und Dendriten gegenüber Kontrollkulturen. Da SNAP-25 licht- und elektronenmikroskopisch in der Plasmamembran von Axonen und Dendriten vorkam, ist die Verkürzung der Fortsätze durch die Beteiligung von SNAP-25 an der konstitutiven Exozytose zu erklären.

Literaturverzeichnis

- Ahnert-Hilger1996 Ahnert-Hilger, G. et al.: Synaptobrevin is essential for secretion but not for the development of synaptic processes Eur. J. Cell Biol. 1996 70 1-11
- Ahnert-Hilger1995 Ahnert-Hilger, G.; Bigalke, H.: Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning Progr. Neurobiol. 1995 46 83-96
- Arnon1992 Arnon, S.S.: Infant botulism In: Textbook of Pediatric Infectious Diseases Ed. Feigen, R.D.; Cherry, J.D. W.B. Saunders & Co 1992 1095-1102
- Banerjee1996 Banerjee, A. et al. SNAP-25 is required for a late postdocking step in calcium-dependent exocytosis J. Biol. Chem. 1996 271 20227-20230
- Banker1977 Banker, G.A.; Cowan, M.: Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture Brain Research 1977 126 397-425
- Bark1993 Bark, I.C.: Structure of the chicken gene for SNAP-25 reveals duplicated exon encoding distinct isoform of the protein J. Mol. Biol. 1993 233 67-76
- Bark1995 Bark, I.C. et al.: Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development Proc. Nat. Acad. Sci. 1995 92 4621-4624
- Bartlett1984 Bartlett, W.P.; Banker, G.A.: An electronmicroscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in cultures J. Neurosci. 1984 4 1944-1953
- Basarsky1994 Basarsky, T.A. et al.: Hippocampal genesis in cell culture J. Neurosci. 1994 4 6402-6411
- Bauerfeind1996 Bauerfeind, R. et al.: Molecular mechanisms in vesicle recycling J. Neurocyt. 1996 5 701-715
- Baumert1989 Baumert, M. et al.: Synaptobrevin: An integral membrane protein of 18 kDa present in small synaptic vesicles of rat brain EMBO J. 1989 8 379-384
- Becher1998 Becher, A. et al.: Der Synaptophysin/ Synaptobrevin-Komplex - Ein Indikator der Reifung synaptischer Vesikel 15. Tagung der Anatomischen Gesellschaft Würzburg (Poster)
- Bennett1992 Bennett, M.K. et al.: Syntaxin : A synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones Science 1992 257 255-259
- Bennett1993a Bennett, M.K. et al.: The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neuron Proc. Natl. Acad. Sci. 90 1993 2559-2563
- Bennett1993b Bennett, M.K. et al.: The syntaxin family of vesicular transport receptors Cell 1993 74 863-873
- Bergmann1991 Bergmann, M. et al.: Expression of Synaptophysin during prenatal development of the rat spinal cord Neurosci. 1991 42 569-582
- Bergmann1993 Bergmann, M. et al.: Synaptophysin and Synaptoporin expression in the developing rat olfactory system Dev. Brain Res. 1993 74 235-244
- Betz1992 Betz, W.J.; Bewick, K.S.: Optical analysis of synaptic vesicle recycling destaining of living vertebrate motor nerve terminals J. Neurosci. 1992 12 363-375
- Binz1994 Binz, T. et al.: proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins J. Biol.

Chem. 1994 269 1617-1620

- Blackstad1961 Blackstad, T.W.; Kjaerheim, A.: Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: Electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers J. Comp. Neurology 1961 117 133-159
- Blasi1993a Blasi, J. et al.: Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25 Nature 1994 365 160-163
- Blasi1993b Blasi, J. et al.: Botulinum neurotoxin C blockes neurotransmitter releaseba means of cleaving HPC1/Syntaxin EMBO J. 1994 12 4821-4828
- Bradke1997 Bradke, F.; Dotti, C.G.: Neuronal polarity: vectorial cytoplasmatic flow precedes axon formation Neuron 1997 19 1175-1186
- Branks1986 Branks, P.L.; Wilson, M.C.: Patterns of gene expression in the murine brain revealed by in situ hybridisation of brain specific mRNAs Brain Res. 1986 387 1-16
- Bray1970 Bray, D.: Surface movements during the growth of single explanted neurons Proc. Natl. Acad. Sci. 1970 65 905-910
- Burgen1949 Burgen, A.S.V. et al.: The action of Botulinum neurotoxin on the neuromuscular junction J. Physiol. 1949 109 10-24
- Caceres1986 Caceres, A. et al.: Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture J. Neurosci. 1986 6 714-722
- Caceres1984 Caceres, A. et al.: MAP-2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture Dev. Brain Res. 1984 13 314-318
- Caceres1990 Caceres, A.; Kosik, K.: Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons Nature 1990 343 461-463
- Calakos1994a Calakos, N.; Scheller, R.H.: Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle J. Biol. Chem. 1994 269 24534-24537
- Calakos1994b Calakos, N. et al.: Protein-protein-interactions contributing to the intracellular vesicle trafficking Science 1994 263 1146-1149
- Cameron1991 Cameron, P.L. et al.: Colocalisation of synaptophysin with transferrin receptors: implications for synaptic vesicle biogenesis J. Cell Biol. 1991 115 151-164
- Catsicas1991 Catsicas, S. et al.: Expression of a conserved cell-type specific protein in nerve terminal coincides with synaptogenesis Proc. Nat. Acad. Sci. 1991 88 785-789
- Chapman1994 Chapman, E.R. et al.: SNAP-25, a t-SNARE whivh binds to both synaptobrevin and syntaxin via domains that may form coiled-coils J. Biol. Chem. 1994 269 27427-27432
- Chicurel1992 Chicurel, M.E. et al.: Threeee-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationship with mossy fiber boutons in the rat hippocampus J. Comp. Neurolog. 1992 325 169-182
- Chin1995 Chin, L.S. et al.: Impairment of axonal developmentand of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin-deficient mice Proc. Nat. Acad. Sci. 1995 92 9230-9234
- Colombo1996 Colombo, M.I. et al.: A possible predocking attachment site for NSF-protein J. Biol. Chem. 1996 271 18810-18816

- Craig1995 Craig, A.M. et al.: Preferential addition of newly synthesized membrane protein at axonal growth cones *Nature* 1995 375 592-594
- Craig1994 Craig, A.M. and Banker, G.A.: Neuronal polarity *Ann. Rev. Neurosci.* 1994 17 267-310
- Craig1993 Craig, A.M. et al.: The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits *Neuron* 1993 10 1055-1068
- Dai1995 Dai, J. and Sheetz, M.P.: Axon membrane flows from the growth cone to the cell body *Cell* 1995 83 693-701
- Dailey1994 Dailey, M.E. et al.: Mossy fiber growth and synaptogenesis in rat hippocampal slices in vitro *J. Neurosci.* 1994 14 1060-1078
- Dailey1993 Dailey, M.E. and Bridgman, P.C.: Vacuole dynamics in growth cones: correlated video and EM observations *J. Neurosci.* 1993 13 3375-3393
- Dayanithi1990 Dayanithi, G. et al.: Release of vasopressin from isolated permeabilized neurosecretory nerve terminals is blocked by the light chain of botulinum A toxin *Neuroscience* 1990 39 711-715
- DeCamilli1984 DeCamilli, P. et al.: Distribution of MAP-2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence *Neuroscience* 1984 11 819-846
- DeCamilli1993 DeCamilli, P.: Exocytosis goes with SNAP *Nature* 1993 364 378-388
- DeChaves1995 DeChaves, E.P. et al.: Axonal synthesis of phosphatidylcholine is required for normal axonal growth in rat sympathetic neurons *J. Cell. Biol.* 1995 128 913-918
- Deitch1993 Deitch, J.S. and Banker, G.A.: An electron microscopic analysis of hippocampal neurons developing in culture: Early stages in the emergence of polarity *J. Neurosci.* 1993 13 4301-4315
- Diaz1996 Diaz-Nido, J. et al.: The role of the cytoskeleton in the morphological changes occurring during neuronal differentiation *Cell Dev. Biol.* 1996 7 733-739
- Dotti1988 Dotti, C. et al.: The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture *J. Neurosci.* 1988 8 1454-1468
- Dotti1987 Dotti, C. and Banker, G.A.: Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons *Nature* 1987 330 254-256
- Dotti1991 Dotti, C. and Banker, G.A.: Intracellular organisation of hippocampal neurons during the development of neuronal polarity *J. Cell Science* 1991 15 75-84
- Duc1995 Duc, C. and Catsicas, S.: Ultrastructural localization of SNAP-25 within the rat spinal cord and peripheral nervous system *J. Comp. Neurol.* 1995 357 1-12
- Edelmann1995 Edelmann, L. et al.: Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine *EMBO J.* 1995 14 224-231
- Fasshauer1997 Fasshauer, D. et al.: A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25 *J. Biol. Chem.* 1997 272 4582-4590
- Fasshauer1998 Fasshauer, D. et al.: Identification of a minimal core of the synaptic SNARE-complex sufficient for reversible assembly and disassembly *Biochem.* 1998 37 10354-10362

- Ferrer1998 Ferrer-Montiel, A.V. et al.: The 26-mer peptide released from SNAP-25 cleavage by botulinum neurotoxin E inhibits vesicle docking FEBS Letters 1998 435 84-88
- FerroNovick1994 Ferro-Novick, S. and Jahn, R.: Everything that fuses must converge: Proteins that mediate fusion from yeast to man Nature 1994 370 191-193
- Fletcher1991 Fletcher, T.L. et al.: The distribution of synapsin1 and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture J. Neurosci. 1991 11 1617-1626
- Fletcher1994 Fletcher, T.L. et al.: Synaptogenesis in hippocampal cultures: evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neuronal development J. Neurosci. 1994 14 6695-6706
- Foran1996 Foran, P. et al.: BoNT C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: Correlation with its blockade of catecholamine release Biochem. 1996 35 2630-2636
- Gaarskjaer1986 Gaarskjaer, F.B.: The organization and development of the hippocampal mossy fiber system Brain Res. Rev. 1986 11 335-357
- Gähwiler1984 Gähwiler, B.H.: Development of the hippocampus in vitro: cell types; synapses and receptors J. Neurosci. 1984 11 751-760
- Galli1998 Galli, T. et al.: A novel tetanus neurotoxin-insensitive VAMP in SNARE-complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells Mol. Biol. Cell 1998 9 1437-1448
- Garcia1995 Garcia, E.P. et al.: rbSec1a and b colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin J. Cell Biol. 1995 129 105-120
- Geddes1990 Geddes, J.W. et al.: Lesions of hippocampal circuitry define SNAP-25 as a novel presynaptic marker Neurosci. 1990 38 515-525
- Geppert1994 Geppert, M. et al.: Synaptotagmin: A major calcium-sensor for transmitter release at a central synapse Cell 1994 79 717-727
- Goslin1990 Goslin, K. et al.: Changes in the distribution of GAP-43 during the development of neuronal polarity J. Neurosci. 1990 10 588-602
- Goslin1991 Goslin, K. and Banker, G.A.: Rat hippocampal neurons in low density culture Culturing nerve cells 1991 Cambridge, MA MIT-Press 251-281
- Grabs1994 Grabs, D. et al.: Differential expression of synaptophysin and synaptoporin during pre- and postnatal development of the rat hippocampal network Eur. J. Neurosci. 1994 6 1765-1771
- Greengard1993 Greengard, P. et al.: Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function Science 1993 259 780-785
- Grosse1998 Grosse, G. et al.: Prenatal hippocampal granule cells in primary cell culture form mossy fiber boutons at pyramidal cell dendrites J. Neurosci. Res. 1998 51 602-611
- Habermann1989 Habermann, E.: Clostridial neurotoxins and the CNS: Functional studies on isolated preparation Simpson, L.L. Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin Academic press, N.Y. 1989 255-280
- Hanson1997a Hanson, P.I. et al.: Neurotransmitter release - four years of SNARE-complexes Curr. Op. Neurobiol. 1997 7 310-315
- Hanson1997b Hanson, P.I. et al.: Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick freeze/ deep etch electron microscopy Cell 1997

- Hao1997 Hao, J.C. et al.: Effects of mutations in VAMP on the assembly of multimeric protein complexes J. Neurosci. 1997 17 1596-1603
- Harel1993 Harel, R. and Futerman, A.H.: Inhibition of sphingolipid synthesis affects axonal outgrowth in cultured hippocampal neurons J. Biol. Chem. 1993 268 14476-14481
- Harel1996 Harel, R. and Futerman, A.H.: A newly synthesized GPI- anchored protein is inserted into axonal membranes along the entire length of the axon and exclusively at the growth cone Brain Research 1996 712 345-348
- Hayashi1994 Hayashi, T. et al.: Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly EMBO J. 1994 13 5051-5061
- Hayashi1995 Hayashi, T. et al.: Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex in vitro EMBO J. 1995 14 2317-2325
- Hess1992 Hess, D.T. et al.: SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS J. Neurosci. 1992 12 4634-4641
- Hirling1996 Hirling, H. and Scheller, R.H.: Phosphorylation of synaptic vesicle proteins: Modulation of the alpha-SNAP interaction with the core-complex Proc. Nat. Acad. Sci. 1996 93 11945-11949
- HöhneZell1996 Höhne-Zell, B. and Gratzl, M.: Adrenal chromaffin cells contain functional different SNAP-25 monomers and SNAP-25/Syntaxin heterodimers FEBS-Letters 1996 394 109-116
- Hunt1994 Hunt, J.M. et al.: A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion Neuron 1994 12 1269-1279
- Igarashi1996 Igarashi, M. et al.: Growth cone collapse and inhibition of neurite growth by BoNT C1: A t-SNARE is involved in axonal growth J. Cell Biol. 1996 134 205-215
- Igarashi1997 Igarashi, M. et al.: The SNAP-receptor complex in growth cones: molecular aspects of the axon terminal development J. Neurosci. 1997 17 1460-1470
- Jareb1991 Jareb, M. and Banker, G.A.: Abstract 17:739 Soc. Neurosci. 1991
- Kee1995 Kee, Y. et al.: Distinct domains of syntaxin are required for synaptic vesicle fusion complex formation and dissociation Neuron 1995 14 991-998
- Kee1996 Kee, Y. and Scheller, R.H.: Localization of synaptotagmin-binding domains on syntaxin J. Neurosci. 1996 16 1975-1981
- Klingauf1998 Klingauf, J. et al.: Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses Nature 1998 394 581-585
- Kraszewski1995 Kraszewski, K. et al.: Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the luminal domain of synaptotagmin J. Neurosci. 1995 15 4328-4342
- Kretschmar1996 Kretschmar, K. et al.: Colocalization on the same synaptic vesicle of syntaxin and SNAP-25 with synaptic vesicle proteins: a reevaluation of functional models required? Neurosci. Res. 1996 26 141-148
- Lin1997 Lin, R.C. and Scheller, R.H.: Structural organization of the synaptic exocytosis core complex Neuron 1997 19 1087-1094

- Littleton1995 Littleton, J.T. et al.: Immunocytochemical analysis of axonal outgrowth in synaptotagmin mutations J. Neurochem. 1995 65 32-40
- Lockerbie1991 Lockerbie, R.O. et al.: Regulated plasmalemmal expansion in nerve growth cones J. Cell Biol. 1991 112 1215-1227
- Loewy1991 Loewy, A. et al.: The major S-methionine labeled rapidly transported protein is identical to SNAP-25, a protein of synaptic terminals J. Neurosci. 1991 3412-3421
- Lupas1991 Lupas, A. et al.: Predicting coiled-coils from protein sequences Science 1991 252 1162-1164
- Lupashin1997 Lupashin, V.V. and Waters, M.G.: T-SNARE activation through transient interaction with a rab-like guanosine triphosphatase Science 1997 276 1255-1258
- Martenson1993 Martenson, C. et al.: Fast axonal transport is required for growth cone advance Nature 1993 366 66-69
- Matsuda1989 Matsuda, M.: The structure of Tetanus toxin In: Botulinum neurotoxin and Tetanus toxin Simpson, L.L. 1989 Academic Press, N.Y. 69-94
- Matteoli1992 Matteoli, M. et al.: Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons J. Cell Biol. 1992 117 849-861
- Matteoli1991 Matteoli, M. et al.: Association of rab3A with synaptic vesicles at late stages of the secretory pathway J. Cell Biol. 1991 115 625-633
- Matthews1996 Matthews, G.: Neurotransmitter release Ann. Rev. Neurosci. 1996 19 219-233
- Matus1981 Matus, A. et al.: High molecular weight microtubule-associated proteins preferentially associated with dendritic microtubules in brain Proc. Nat. Acad. Sci. 1981 78 3010-3014
- Maycox1992 Maycox, P.A. et al.: Clathrin-coated vesicles in nervous tissues are involved primarily in synaptic vesicle recycling J. Cell Biol. 1992 118 1379-1388
- Mayer1996 Mayer, A. et al.: Sec18p-driven release of Sec17p can precede docking and fusion of yeast vacuoles Cell 1996 85 83-94
- Meffert1996 Meffert, M.K. et al.: Nitric oxide stimulates calcium-independent synaptic vesicle release Neuron 1996 12 1235-1244
- Montecucco1996 Montecucco, C. et al.: Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications Mol. Med. Today 1996 418-424
- Morel1998 Morel, N. et al.: A syntaxin-SNAP-25-VAMP complex is formed without docking of synaptic vesicles J. Physiol. Paris 1998 92 389-392
- Morris1989 Morris, R.E. et al.: Entry of bacterial toxins into mammalian cells In: Botulinum neurotoxin and tetanus toxin Simpson, L.L. Academic Press, N.Y. 1989 121-152
- Mundigl1993 Mundigl, O. et al.: Synaptic vesicle proteins and early endosomes in cultured hippocampal neurons J. Cell Biol. 1993 122 1207-1221
- Murthy1998 Murthy, V.N. and Stevens, C.F.: Synaptic vesicles retain their identity through the endocytotic cycle Nature 1998 392 497-501
- Nichols1997 Nichols, B.J. et al.: Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs Nature 1997 387 199-202

- Nicholson1998 Nicholson, K.L. et al.: Regulation of SNARE-complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p *Nature Struct. Biol.* 1998 9 793-802
- Nishiki1994 Nishiki, T. et al.: Identification of protein receptor for clostridium botulinum type E neurotoxin in rat brain synaptosomes *J. Biol. Chem.* 1994 269 10498-10503
- Nowakowski1979 Nowakowski, R.S. and Rakic, P.: The mode of migration of neurons to the hippocampus *J. Neurocyt.* 1979 8 697-718
- OsenSand1996 Osen-Sand, A. et al.: Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release *J. Comp. Neurol.* 1996 367 222-234
- OsenSand1993 Osen-Sand, A. et al.: Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo *Nature* 1993 364 445-448
- Otto1997 Otto, H. et al.: Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1997 94 6197-6201
- Ovtscharoff1993 Ovtscharoff, W. et al.: Ontogeny of synaptophysin and synaptoporin in the central nervous system: Differential expression in striatal neurons and their afferents during development *Dev. Brain Res.* 1993 72 219-225
- Oyler1989 Oyler, G.A. et al.: The identification of a novel synaptosomal- associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations *J. Cell Biol.* 1989 109 3039-3052
- Oyler1991 Oyler, G.A. et al.: Developmental expression of SNAP-25 in rat brain *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1991 88 5347-5351
- Patel1998 Patel, S.K. et al.: Organelle membrane fusion: a novel function for the syntaxin homolog Ufe1p in ER membrane fusion *Cell* 1998 92 611-620
- Pellegrini1995 Pellegrini, L.L. et al.: Clostridial neurotoxins compromise the stability of a low energy SNARE complex mediating NSF activation of synaptic vesicle fusion *EMBO J.* 1995 14 4705-4713
- Pellizzari1996 Pellizzari, R. et al.: Structural determinants of the specificity for VAMP of tetanus and botulinum type B and G neurotoxins *J. Biol. Chem.* 1996 271 20353-20358
- Pellizzari1997 Pellizzari, R. et al.: The interaction of VAMP with botulinum type D and F neurotoxins *FEBS Letters* 1997 409 339-342
- Peters1976 Peters, A. et al.: The fine structures of the nervous system. The neurons and supporting cells W.B. Saunders & Co. Philadelphia
- Pevsner1994 Pevsner, J. et al.: Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex *Neuron* 1994 13 353-361
- Pfenninger1993 Pfenninger, K.H. and Friedmann, L.B.: Sites of plasmalemmal expansion in growth cones *Dev. Brain Res.* 1993 71 181-192
- Pfenninger1981 Pfenninger, K.H. and Maylie-Pfenninger, M.F.: Lectin labeling of sprouting neurons *J. Cell Biol.* 1981 89 536-559
- Poirier1998 Poirier, M.A. et al.: The synaptic SNARE complex is a parallel fourstranded helical bundle *Nature Struct. Biol.* 1998 5 765-769
- Popov1993 Popov, S. et al.: Forward plasmamembrane flow in growing nerve processes *Science* 1993 259 244-246

- Ravichandran1996 Ravichandran, V. et al.: Identification of a novel syntaxin-synaptobrevin -binding protein: SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues J. Biol. Chem. 1996 271 13300-13303
- Risinger1990 Risinger, C. et al.: Strong evolutionary conservation of SNAP-25 between drosophila, goldfish, chicken and mouse Soc. Neurosci. Abstr.16 : 355
- Rogawski1989 Rogawski, M.A. and Tacket, C.O.: Botulism In: Botulinum neurotoxin and Tetanus toxin Simpson, L.L. 1989 Academic Press, N.Y. 351-378
- Rossetto1994 Rossetto, O. et al.: SNARE motif and neurotoxins Nature 1994 372 415-416
- Rothman1994 Rothman, J.E.: mechanisms of intracellular protein transport Nature 1994 372 55-63
- Rothman1996 Rothman, J.E. and Wieland, F.T.: Protein sorting by transport vesicles Science 1996 272 227-234
- Ryan1996 Ryan, T.A.: Endocytosis at nerve terminals: timing is everything Neuron 1996 17 1035-1037
- Ryan1993 Ryan, T.A. et al.: The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons Neuron 1993 11 713-724
- Sadoul1995 Sadoul, K. et al.: SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release J. Cell Biol. 1995 128 1019-1028
- Sadoul1997 Sadoul, K. et al.: SNAP-23 is not cleaved by botulinum neurotoxin E and can replace SNAP-25 in the process of insulin secretion J. Biol. Chem. 1997 272 33023-33027
- Sanders1998 Sanders, J.D. et al.: Differential turnover of syntaxin and SNAP-25 during synaptogenesis in cultured cerebellar granule neurons J. Neurosci. Res. 1998 670-676
- Schiavo1992a Schiavo, G. et al.: Tetanus and botulinum B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin Nature 1992a 359 832-835
- Schiavo1992b Schiavo, G. et al.: Tetanus toxin is a zinc prtoein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc EMBO J. 1992b 11 3577-3583
- Schiavo1993 Schiavo, G. et al.: Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc-endopeptidase specific for synaptobrevin J. Biol. Chem. 1993 268 11516-11519
- Schiavo1997 Schiavo, G. et al.: Binding of the v-SNARE Synaptotagmin to the t-SNARE SNAP-25 can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses Proc. Nat. Acad. Sci. 1997 94 997-1001
- Schulze1995 Schulze, K.L. et al.: Genetic and electrophysiologic studies on Drosophila syntaxin 1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission Cell 1995 80 311-320
- Scott1980 Scott, A.B.: Botulinum injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery Ophthalmology 1980 87 1044-1049
- Sefton1987 Sefton, B.M. and Buss, J.E.: The covalent modification of eucaryotic proteins with lipid J. Cell Biol. 1987 104 1449-1453
- Shao1997 Shao, X. et al.: Synaptotagmin-syntaxin interaction: The C2-domain as calcium-dependent electrostatic switch Neuron 1997 18 133-142

- Shiao1993 Shiao, Y.J. and Vance, J.E.: Sphingomyelin-transport to the cell surface occurs independently of protein secretion in rat hepatocytes J. Biol. Chem. 1993 268 26085-26092
- Shiff1997 Shiff, G. and Morel, N.: Association of syntaxin with SNAP-25 and VAMP during axonal transport J. Neurosci. Res. 1997 48 313-323
- Simpson1989 Simpson, L.: peripheral actions of botulinum toxins In: Botulinum neurotoxin and Tetanus toxin Simpson, L.L. Academic Press, N.Y. 1989 153-179
- Söllner1993a Söllner, T. et al.: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion Nature 1993a 362 318-324
- Söllner1993b Söllner, T. et al.: A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion Cell 1993b 75 409-418
- Stecher1989 Stecher, B. et al.: The light chain but not the heavy chain of botulinum A toxin inhibits exocytosis from permeabilized adrenal chromaffin cells FEBS Letters 1989 255 391-394
- Strichartz1984 Strichartz, G.R. et al.: Components of the plasmamembrane of growing axons J. Biol. Cell 1984 98 1444-1452
- Südhof1997 Südhof, T.C.: Function of rab3 GDP-GTP exchange Neuron 1997 18 519-522
- Südhof1995 Südhof, T.C.: The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interactions nature 1995 375 645-653
- Sutton1998 Sutton, R.B. et al.: Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution Nature 1998 395 347-353
- Sweeney1995 Sweeney, S.T. et al.: targeted expression of tetanus light chain in Drosophila specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects Neuron 1995 14 341-351
- Takei1996 Takei, K. et al.: The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin J. Cell Biol. 1996 133 1237-1250
- Tanaka1995 Tanaka, E. and Sabry, J.: Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance Cell 1995 83 171-176
- TixierVidal1992 Tixier-Vidal, A. et al.: Differential expression and subcellular localization of secretogranin II and synaptophysin during early development of mouse hypothalamic neurons in culture Neurosci. 1992 47 967-978
- Tömböl1978 Tömböl, T. et al.: granule cells, mossy fibres and pyramidal neurons: An electron microscopy study of the cat's hippocampal formation I. Acta Morphol. Acad. Sci. Hung. 1978 26 291-310
- Trimble1988 Trimble, W.S. et al.: VAMP1: a synaptic vesicle -associated integral membrane protein Proc. Nat. Acad. Sci. 1988 85 4538
- Vance1994 Vance, J.E. et al.: Biosynthesis of membrane lipids in rat axons J. Neurochem. 1994 62 329-337
- Verderio1995 Verderio, C. et al.: Calcium-dependent glutamate released during neuronal development and synaptogenesis Proc. Nat. Acad. Sci. 1995 92 6449-6453
- Verderio1994 Verderio, C. et al.: Activity independent spatial changes in calcium signalling during

the establishment of neuronal polarity J. Cell Biol. 1994 126 1527-1536

- Walch1995 Walch-Solimena, C. et al.: The t-SNAREs syntaxin1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling J. Cell Biol. 1995 128 637-645
- Wallace1996 Wallace, B.G.: Signaling mechanisms indicating synapse formation Bio Essays 1996 18 777-780
- Washbourne1995 Washbourne, P. et al.: Vamp2 forms a complex with synaptophysin Biochem. J. 1995 305 721-724
- Weber1998 Weber, T. et al.: SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion Cell 1998 92 759-772
- Weller1991 Weller, U. et al.: Chains and fragments of tetanus toxin Eur. J. Biochem. 1991 182 245-248
- Williamson1998 Williamson, L.C. and Neale, E.A.: Syntaxin and SNAP-25: Differential effects of Botulinum neurotoxins C1 and A on neuronal survival J. Neurosci. Res. 1998 52 569-583
- Williamson1996 Williamson, L.C. et al.: Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons J. Biol. Chem. 1996 271 7694-7699
- Wilson1996 Wilson, M.C. et al.: SNAP-25, enSNAREd in neurotransmission and regulation of behaviour Biochem. Soc. trans. 1996 24 670-676
- Wong1997 Wong, P.P.C. et al.: Tissue distribution of SNAP-23 and its subcellular localization in 3T3-L1 cells Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997 230 64-68
- Wu1998 Wu, G.Y. and Kline, H.T.: Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMK II Science 1998 279 222-226
- Xu1998 Xu, T. et al.: Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity Nature Neurosci. 1998 1 192-200
- Yamasaki1994a Yamasaki, S. et al.: Cleavage of members of the synaptobrevin family by types F and D botulinum neurotoxins and tetanus toxin J. Biol. Chem. 1994a 269 12764-12772
- Yamasaki1994b Yamasaki, S. et al.: Botulinum neurotoxin type G proteolysis the Ala81-Ala82 bond of rat synaptobrevin 2 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994b 200 829
- Zhang1994 Zhang, J.Z. et al.: Synaptotagmin1 is a high affinity receptor for clathrin AP2: implications for membrane recycling Cell 1994 78 751-760
- Zhong1997 Zhong, P. et al.: An alpha-helical minimal binding domain within the H3-Domain of syntaxin is required for SNAP-25 binding Biochem. 1997 36 4317-4326
- Zimmer1987 Zimmer, J. and Gähwiler, B.H.: Growth of hippocampal mossy fibres: A lesion and coculture study of organotypic slice cultures J. Comp. Neurol. 1987 264 1-13

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Arbeitskonzentrationen der Primärantikörper beim Westernblotverfahren	19
Tabelle 2: Konzentrationen der zytochemisch verwandten Primärantikörper	20
Tabelle 3: Konzentrationen der verwandten Sekundärantikörper	20
Tabelle 4: Einfluß von Botulinumneurotoxin A auf das Wachstum von Axonen und Dendriten	44
Tabelle 5: Blockierung der Transmitterexozytose durch Botulinumneurotoxin A	45
Tabelle 6: Botulinumneurotoxin A beeinflusst die Zelldichte in hippocampalen Zellkulturen	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die minimalen Bindungsregionen der SNARE-Proteine (nach Fasshauer1998)	6
Abbildung 2: Der synaptische Fusionskomplex (nach Sutton1998)	7
Abbildung 3: Pyramidenzelle nach 1 DIV	23
Abbildung 4: Körnerzelle nach 2 DIV	24
Abbildung 5: Die hippocampale Zellkultur nach 3 DIV	24
Abbildung 6: Sechs Tage altes Pyramidenneuron	25
Abbildung 7: Ultrastruktur der neuronalen Somata nach 6 DIV	25
Abbildung 8: Ultrastruktur eines Neurons nach 6 DIV	26
Abbildung 9: Ultrastruktur eines Neurons nach 6 DIV	26
Abbildung 10: Ultrastruktur von Axonen nach 6 DIV	27
Abbildung 11: Ultrastruktur des Axons einer Körnerzelle nach 6 DIV	27
Abbildung 12: Hippocampusneurone nach 11 Tagen Kultivierung	28
Abbildung 13: Ultrastruktur einer Synapse nach 11 DIV	28
Abbildung 14: 20 Tage alte Körnerzelle	29
Abbildung 15: Hippocampale Moosfaserboutons nach 32 DIV	30
Abbildung 16: Myelinscheide nach 32 DIV	30
Abbildung 17: Vorkommen von SNAP-25 nach 23 DIV	31
Abbildung 18: Verteilung von SNAP-25 nach 6 DIV	32
Abbildung 19: SNAP-25 nach 6 DIV	33
Abbildung 20: Transferrinrezeptor nach 6 DIV	33
Abbildung 21: SNAP-25 nach 11 DIV	34
Abbildung 22: Synaptophysin nach 11 DIV	34
Abbildung 23: Kolokalisation von SNAP-25 und Synaptophysin nach 12 DIV	35
Abbildung 24: SNAP-25 nach 23 DIV	36
Abbildung 25: Synaptophysin nach 23 DIV	36
Abbildung 26: Ultrastruktur eines axo-dendritischen Kontaktes nach 13 DIV	37
Abbildung 27: Photomontage eines Axons	38
Abbildung 28: Ultrastruktur eines Perikaryonausschnittes	39
Abbildung 29: Ultrastruktur eines axo-dendritischen Kontaktes	39
Abbildung 30: Ultrastruktur eines Dendriten	40
Abbildung 31: Der Einfluß von Bo/NT A auf sein Substrat SNAP-25	41
Abbildung 32: BoNT/A-vergiftetes Neuron nach 2 DIV	41
Abbildung 33: Unbehandeltes Neuron nach 2 DIV	41
Abbildung 34	42
Abbildung 35	42
Abbildung 36: SNAP-25 in der BoNT/A-vergifteten Zellkultur	43
Abbildung 37: Synaptophysin in der BoNT/A-vergifteten Zellkultur	43
Abbildung 38: BoNT/A hemmt die synaptische Exozytose	45
Abbildung 39: BoNT/C spaltet Syntaxin und SNAP-25	46

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Fetter
Vorname	Ingmar
Geburtstag	15.7.1973
Geburtsort	Neuruppin
Anschrift	Kastanienallee 11, 10435 Berlin
Familienstand	ledig

Schulische Daten

1980-1988	Besuch der Grundschule Alt Ruppin
1988-1990	Besuch der Schule des Friedens Neuruppin
1990-1992	Abitur am Gymnasium Neuruppin
	Hochschulreife am 25.06.1992 erlangt

Ausbildung

1992-1993	Zivildienst im Ruppiner Klinikum (01.07.92 – 30.09.93)
1993-2000	Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
	- Ärztliche Vorprüfung am 17.8.1995 bestanden
	- 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 29.8.1996 bestanden
	- 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 29.3.1999 bestanden
	- 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 6.6.2000 bestanden
28.6.1999	Promotion zum Dr. med. (magna cum laude)

Berlin, den 25.7.2000

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig und unter ausschließlicher Nutzung der aufgeführten Literaturquellen, Materialien und Methoden angefertigt zu haben.

Berlin, den 27. Januar 1999